



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“Evaluación de la eficacia de la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB) en la determinación de la competencia de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero”

Tesis previa a la obtención del Título de
Médico Veterinario Zootecnista.

Autor:

José Mauricio Duma Pauta.

CI: 0106339708

Director:

Luis Eduardo Ayala Guanga PhD CI: 0102635463

CUENCA-ECUADOR

27/03/2019

Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia de la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB) para determinar la competencia de maduración, clivaje, y progreso al estado de blastocisto de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero. Los complejos cumulus ovocitos (COC's: $n= 2.340$) provenientes de 388 ovarios de matadero fueron recuperados por aspiración folicular, clasificados de forma tradicional con base a la morfología del ovocito y luego expuestos a 90 minutos a la tinción BCB. Se evaluaron tres tratamientos. G1: Testigo (sin exposición al BCB), G2: BCB+, G3: BCB-. Se determinó la morfometría antes y después de la maduración *in vitro* (MIV), la maduración morfológica de acuerdo a la expansión de las células del cumulus, la maduración nuclear, el porcentaje de clivaje, blastocitos y porcentaje global embriones (mórulas y blastocistos) al día 8. El 62,3% de ovocitos expuestos al BCB fueron positivos BCB+ (G2) y tuvieron un diámetro mayor antes ($135,9 \mu\text{m}$) y después ($134,8 \mu\text{m}$) de la MIV ($p<0.05$) que los ovocitos del grupo BCB- ($128,1$ y $127,6 \mu\text{m}$) y el grupo Testigo o Control ($129,0$ y $128,2 \mu\text{m}$). La maduración morfológica (expansión del cumulus) y la configuración meiótica de los diferentes estadios de maduración nuclear no fue diferente entre grupos ($p>0.05$). El porcentaje de clivaje fue significativamente mayor ($p<0.05$) en el grupo Testigo (43,4%) que el grupo BCB+ (33,5%). El porcentaje de blastocistos no varió entre grupos ($p>0.05$). (G1: 19,3%; G2: 24,8%; G3: 13,6%). Finalmente, el porcentaje global de embriones fue mayor en el grupo BCB+ (52,6%) que el grupo Testigo (32,6%) y BCB- (33,5%). Los resultados establecen que la tinción azul brillante de cresilo permitió seleccionar ovocitos con mayor diámetro y volumen (BCB+), con nula o baja actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH); a pesar de que no permitió aumentar el porcentaje de maduración y clivaje, contribuyó a mejorar el porcentaje global de embriones obtenidos *in vitro*.

Palabras clave: AZUL BRILLANTE DE CRESILO, OVOCITOS, *IN VITRO*, BLASTOCISTOS.

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the efficacy of the Brilliant Cresyl Blue (BCB) test to determine the competence of maturation, cleavage and progress in the blastocyst status of bovine oocytes in slaughterhouse ovaries. The oocyte complexes (COC: $n = 2,340$) of 388 ovaries of sacrifice were recovered by follicular aspiration, formed in a traditional way with the morphology of the oocyte and then at 90 minutes of BCB staining. Three treatments were evaluated. G1: Control (without exposure to BCB), G2: BCB +, G3: BCB-. Morphometry was determined before and after *in vitro* maturation (IVM), morphological maturation according to the expansion of the cumulus cells, nuclear maturation, percentage of cleavage, blastocytes and the total percentage of embryos (morulas and blastocysts) on day 8. 62.3% of the oocytes in the BCB were BCB positive + (G2) and had a larger diameter before ($135.9 \mu\text{m}$) and after ($134.8 \mu\text{m}$) of the MIV ($p < 0.05$) than the oocytes of the BCB group - (128.1 and $127.6 \mu\text{m}$) and the Control or Control group (129.0 and $128.2 \mu\text{m}$). The morphological maturation (group expansion) and the configuration of the different stages of nuclear maturation did not differ between the groups ($p > 0.05$). The percentage of cleavage was significantly higher ($p < 0.05$) in the control group (43.4%) than in the BCB + group (33.5%). The percentage of blastocysts did not vary between the groups ($p > 0.05$). (G1: 19.3%; G2: 24.8%; G3: 13.6%). Finally, the general percentage of interest was higher in the BCB + group (52.6%) than in the Control group (32.6%) and BCB- (33.5%). The results establish that brilliant cresyl blue staining allowed to select oocytes with greater diameter and volume (BCB +), with no or low activity of the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH); although it did not allow to increase the percentage of maturation and cleavage, it contributed to improve the overall percentage of embryos obtained *in vitro*.

Keywords: BRILLIANT CRESYL BLUE, OOCYTES, *IN VITRO*, BLASTOCYST.



Índice de Contenido

1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 Objetivos	16
1.1.1 General	16
1.1.2 Específicos	16
1.2 Hipótesis	16
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Generalidades de la fisiología reproductiva de la hembra bovina	17
2.1.1 Ovogénesis	17
2.1.2 Foliculogénesis	18
2.1.3 Folículos primordiales	18
2.1.4 Folículos primarios y secundarios	19
2.1.5 Folículo terciario, antral	19
2.2 Biotecnologías de la reproducción animal	19
2.3 Producción <i>in vitro</i> de embriones (PIV)	19
2.3.1 Reseña histórica de la producción de embriones <i>in vitro</i>	19
2.3.2 Ventajas y desventajas de la PIV con ovarios de animales faenados	20
2.3.3 Factores que afectan la calidad de los ovocitos para la PIV	20
2.3.4 Evaluación de la calidad de los ovocitos	23
2.4 Protocolo de producción de embriones <i>in vitro</i>	26
2.4.1 Colección de los ovarios bovinos procedentes de matadero	27
2.4.2 Transporte de ovarios de matadero	27
2.4.3 Almacenamiento de los ovocitos y su relación con la calidad	27
2.4.4 Aspiración de ovocitos	28
2.4.5 Maduración de ovocitos (MIV)	28
2.4.6 Fertilización <i>in vitro</i> (FIV)	31
2.4.7 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1 Materiales	35
3.1.1 Materiales Biológicos	35
3.1.2 Materiales Químicos	35
3.1.3 Instrumental de Laboratorio	35
3.1.4 Materiales de campo	36
3.1.5 Equipos	36



3.2	Métodos	37
3.2.1	El área de estudio.....	37
3.2.2	Ubicación política-geográfica.....	37
3.3	Unidad Experimental.....	37
3.4	Metodología de la Investigación experimental	38
3.4.1	Recolección de ovarios, aspiración folicular y obtención de COC's 38	
3.4.2	Clasificación de los COC's	38
3.4.3	Tinción de los COC's mediante Azul brillante de cresilo	40
3.4.4	Determinación de la morfometría de los COC's inmaduros	40
3.4.5	Maduración <i>in vitro</i> (MIV).....	41
3.4.6	Evaluación de la morfometría post maduración.....	41
3.4.7	Evaluación de la progresión de la meiosis luego de la MIV	42
3.4.8	Fecundación <i>in vitro</i> (FIV).....	43
3.4.9	Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	43
3.5	Diseño experimental.....	43
3.6	Análisis estadístico.....	44
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
4.1	Recuperación de COC's	45
4.2	Clasificación morfológica de COC's.....	45
4.3	Prueba del Azul brillante de cresilo	45
4.4	Morfometría de los ovocitos antes y despues de la MIV	46
4.4.1	Diámetro total del ovocito	46
4.4.2	Volumen del ovocito	48
4.4.3	Diámetro del citoplasma del ovocito	49
4.4.4	Tamaño de espacio perivitelino (PVS).....	50
4.4.5	Espesor de la zona pelúcida (ZP).....	52
4.5	Maduración morfológica-Expansión de las células del cúmulus	53
4.5.1	Maduración nuclear o progresión de la Meiosis	54
4.5.2	Comparación de la maduración morfológica y nuclear	56
4.6	Desarrollo embrionario: clivaje y blastocistos.....	57
5.	CONCLUSIONES	60
6.	RECOMENDACIONES.....	61
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	62
8.	ANEXOS.....	70



8.1	Fotografías de la investigación.....	70
-----	--------------------------------------	----

Índice de Gráficos

Gráfico 1:	Clasificación morfológica de los COC's.....	24
Gráfico 2:	Ubicación del Laboratorio de Biotecnología en la Granja Irquis	37
Gráfico 3:	Promedio del diámetro total del ovocito en los tres tratamientos valorados pre y post maduración.	48
Gráfico 4:	Promedio del volumen del ovocito en los tres tratamientos, valorados en pre y pos maduración.	49
Gráfico 5:	Promedio del diámetro del citoplasma del ovocito en los tres tratamientos, valorados en pre y post maduración.....	50
Gráfico 6:	Promedio del espacio perivitelino del ovocito en los tres tratamientos, valorados en pre y post maduración.....	52
Gráfico 7:	Promedio del ancho de la zona pelúcida (ZP) en los tres tratamientos, valorados en pre y post maduración.....	53
Gráfico 8:	Porcentaje de maduración de los ovocitos en los diferentes tratamientos, determinada por el grado de expansión de las células de cúmulus (grado de musificación) Prueba de Tukey al 5%.	54
Gráfico 9:	Configuración meiótica de los ovocitos luego del proceso de maduración <i>in vitro</i> en los diferentes tratamientos.	56
Gráfico 10:	Comparación del grado de maduración morfológico (expansión de las células del cúmulus) vs maduración nuclear.	57

Índice de Tablas

Tabla 1:	Clasificación morfológica de los COC's	39
Tabla 2:	Actividad de la G6PDH en ovocitos inmaduros sometidos a BCB.....	45
Tabla 3:	Tasa de clivaje de ovocitos fertilizados de los diferentes grupos.....	58
Tabla 4:	Tasa de desarrollo embrionario de los diferentes grupos.	59



Índice de Anexos

Anexo 1: Ovocitos aptos (categoría A y B) y no aptos (categoría C y D).	70
Anexo 2: Ovocitos BCB+ y BCB-	70
Anexo 3: Expansión de las células del cúmulus luego de la MIV.	70
Anexo 4: Ovocitos en estado de GV y GVBD teñidos con Hoechst, vistos con microscopio de fluorescencia.	71
Anexo 5: Ovocitos en estado de MI y MII teñidos con Hoechst, vistos con microscopio de fluorescencia.	71
Anexo 6: Ovocitos medidos antes y después de la MIV mediante software CaptaVisión.	71
Anexo 7: Evaluación de clivaje, 48 h luego de la FIV	72
Anexo 8: Blastocistos expandidos y protruidos luego de 8 días de CIV.	72
Anexo 9: Ovarios bovinos colectados de matadero.	72
Anexo 10: Líquido folicular colectado luego de aspiración / Tinción BCB.	73
Anexo 11: Denudado de ovocitos previo a la evaluación de morfometría.	73
Anexo 12: Ficha técnica del producto Azul Brillante de cresilo (BCB).....	74
Anexo 13: Modelos de registros para la recolección de datos.	76



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yo, José Mauricio Duma Pauta en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Evaluación de la eficacia de la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB) en la determinación de la competencia de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 27 de Marzo del 2019

José Mauricio Duma Pauta

C.I: 0106339708



Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, José Mauricio Duma Pauta, autor del trabajo de titulación “Evaluación de la eficacia de la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB) en la determinación de la competencia de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 27 de Marzo del 2019

José Mauricio Duma Pauta

C.I: 0106339708



Agradecimiento

La ingratitud es imperdonable según mis principios, como no agradecer a las personas que contribuyeron durante todo el desarrollo de este trabajo de titulación. Primeramente, agradezco al Dr. Luis Ayala, mi director de tesis, por su paciencia desinteresada, por compartir sus conocimientos y su experiencia, por ser mi guía y apoyarme en mis aspiraciones. Con la misma gratitud, al Dr. Daniel Argudo, al Dr. Fernando Perea y a todos aquellos profesionales que fueron pilares fundamentales del trabajo práctico en el laboratorio.

Agradezco infinitamente a mis padres y mis hermanas quienes son, sin ninguna duda mi mayor motivación. Gracias por su paciencia, apoyo, dedicación y por educarme con esmero todos estos años durante mi carrera universitaria.

Finalmente, un agradecimiento sincero para mis amigos, mis compañeros de aula por su apoyo, por sus críticas constructivas y por sus felicitaciones.



Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo de tesis a mis Padres, personas que admiro mucho, quienes me brindan la energía, el aliento de superación y la motivación de seguir adelante con mis metas. También de manera muy especial a mis profesores de toda mi carrera universitaria, que son mi ejemplo y la influencia positiva, a mis maestros de vida que están inmersos en la sociedad y finalmente a las personas que confían en mí y que con sus valores me ayudan a crecer como ser humano.

Con mucho cariño para ustedes.

José Mauricio Duma Pauta

Abreviatura y simbología

COC's: Complejo cúmulus ovocitos

BCB: Azul brillante de cresilo

G6PDH: Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa

PIV: Producción *in vitro* de embriones

MIV: Maduración *in vitro*

FIV: Fertilización *in vitro*

CIV: Cultivo *in vitro*

FSH: Hormona folículo estimulante

LH: Hormona luteinizante

GV: Vesícula germinal

GVBD: Rotura de vesícula germinal

MI: Metafase I

MII: Metafase II

BD: Cuerpo polar

μl: Microlitro

μm: Micro molar

μm: micra

PVS: Espacio perivitelino

ZP: Zona pelúcida

AH: Ácido hialurónico

TCM-199: Tissue Culture Médium 199

TALP: Tyrode-albúmina-lactato-piruvato

BSA: Albúmina Sérica Bovina

H-SOF: Hepes-Fluido oviductal sintético

mDPBS: Solución buffer fosfato de Dulbecco.

1. INTRODUCCIÓN

La obtención de ovocitos bovinos post mortem de ovarios de matadero para la producción *in vitro* de embriones (PIV) actualmente constituye una estrategia positiva que permite la utilización de un considerable número de ovocitos de animales de gran valor genético, muertos por accidente o sacrificados al llegar al final de su vida productiva (1). Sin embargo, la PIV es una biotecnología de éxito limitado, debido principalmente a que los ovocitos inmaduros especialmente de vacas con bajo rendimiento reproductivo son heterogéneos en calidad y competencia considerando que se recuperan en diferentes etapas de crecimiento o atresia (2). Diversos estudios realizados con ovocitos bovinos han demostrado que únicamente entre un 25 y 40% de los ovocitos seleccionados inicialmente alcanzan el estado de blastocisto (3).

Estos resultados se debe a varios factores, dentro de los que sobresale el estado de maduración y la calidad de los ovocitos, atributos que juegan un papel esencial en la determinación de la competencia y desarrollo embrionario temprano (4). El estado de maduración involucra la reanudación meiótica, por acción de las gonadotropinas, cuando el ovocito alcanza un diámetro de 110 μm lo cual coincide con la terminación de la síntesis de ARNm, y la finalización de la fase de crecimiento (5).

En la actualidad la técnica usada para seleccionar ovocitos competentes para la PIV, se basa en la valoración de las características morfológicas de las células del cúmulus y de la homogeneidad del citoplasma (6); sin embargo, es muy subjetiva. De allí que en los últimos años se ha venido investigando un marcador del cese del crecimiento de ovocitos o un predictor no invasivo e indirecto de las características subyacentes de su calidad y competencia, mediante el uso de la tinción vital denominada Azul brillante cresilo (BCB), colorante que determina la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfatato deshidrogenasa (G6PDH), la misma que disminuye a medida que los ovocitos alcanzan su tamaño máximo; de modo que los ovocitos completamente desarrollados al tener baja o nula actividad de esta enzima no puede degradar el colorante BCB y el ovocito queda teñido. Por el contrario, los ovocitos que



aún no han terminado el crecimiento tienen alta actividad enzimática de la G6PDH, la misma que degrada el colorante y son considerados BCB- (7).

Basado en este principio se han realizado investigaciones en ovocitos de diferentes animales (vaca, oveja, cerda, cabra (3);(7); (8);(9), para determinar la eficacia de la selección de ovocitos competentes empleando la tinción vital del Azul brillante de cresilo; sin embargo, los resultados encontrados en las diversas investigaciones son contradictorios, algunos autores favorecen el uso y la efectividad de la tinción BCB (3);(10);(11); por el contrario otras investigaciones han sugerido que la exposición a la tinción causa efectos adversos en el ADN de los ovocitos y afecta el desarrollo de embriones producidos *in vitro* (8);(12).

1.1 Objetivos

1.1.1 General

Evaluar la eficacia de la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB) para determinar la competencia de maduración, potencial de fertilización, y progreso al estado de blastocisto de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero.

1.1.2 Específicos

- Comprobar si el estado metabólico de los ovocitos bovinos determinado por la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa tiene relación con su diámetro y volumen antes y después de la maduración.
- Determinar si la capacidad de maduración de los COC's es afectada por la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa luego de ser colectados del ambiente intrafolicular.
- Evaluar si la selección de COC's mediante la prueba del Azul Brillante de Cresilo permite mejorar el clivaje y el número de blastocistos transferibles obtenidos *in vitro*.

1.2 Hipótesis

Los ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero que resultan positivos a la prueba vital del Azul Brillante de Cresilo (BCB+) presentan mayor competencia para madurar, lograr la fecundación y desarrollarse al estado de blastocistos, en comparación a los ovocitos negativos a esta prueba (BCB-).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Generalidades de la fisiología reproductiva de la hembra bovina

2.1.1 Ovogénesis

El desempeño reproductivo en la especie bovina está determinado por la eficiencia de las hembras, cuyo desarrollo inicia mucho antes del nacimiento, es decir desde el estado fetal (13). La ovogénesis por lo tanto es el proceso de formación y desarrollo de la célula sexual femenina conocida como ovocito u ovulo desde su estado de ovogonia. El ovario en la especie bovina en su inicio se presenta como un engrosamiento del epitelio celómico en la cara medial del mesonefro alrededor del día 30 de la vida fetal. Las células germinales primordiales migran del endodermo del saco vitelino a través del intestino posterior en desarrollo y luego a lo largo del mesenterio dorsal para colonizar las gónadas en desarrollo, en donde se diferencian en ovogonias (14).

A partir de ese momento estas células experimentan diversas divisiones mitóticas que son específicas para cada especie y luego se diferencian en ovocitos primarios previo al inicio de la primera división meiótica (15). En los meses siguientes el ovario continua su fase de proliferación y el número de ovogonias aumenta y alcanza su cifra máxima; no obstante, muchas células empiezan a morir, las ovogonias y los ovocitos primarios degeneran y se vuelven atresicos (16). De acuerdo a esto, se estima que al momento del nacimiento el número total de ovocitos disponibles en la especie bovina es de 75 000 a 300 000 (17).

Todos los ovocitos primarios que han superado la atresia inician la profase de la primera división meiótica al día 80 del desarrollo fetal, pero detienen esta división en Profase I, en la fase de diploteno, una etapa de reposo que se caracteriza por una red laxa de cromatina. Los ovocitos primarios no reactivaran la profase I de la meiosis hasta la pubertad, después de ocurrir el pico pre ovulatorio de LH (18). Esta fase de reposo es llamada estado dictiático y esta inducida por el inhibidor de la maduración del ovocito, péptido secretado por las células foliculares (19).

De la misma manera es importante considerar que la expresión genética específica del sexo se produce tempranamente, por lo tanto la diferenciación

sexual gonadal ocurre en el día 40 en los bovinos (19). Además está evidenciado que el desarrollo ovárico es más rápido que el desarrollo testicular y depende de la expresión del gen SRY (14).

2.1.2 Foliculogénesis

El proceso de foliculogénesis consiste en el crecimiento y diferenciación de los folículos primordiales en folículos maduros o folículos de Graaf (20). Se considera un proceso continuo e irreversible (21). Los folículos crecen en oleadas u ondas foliculares. De esta manera, dentro de un ciclo estral de 21 días se dan aproximadamente 2 a 3 ondas u oleadas foliculares (22). Los folículos primordiales al iniciar su proceso de maduración o crecimiento tienen dos alternativas, la primera es la atresia que ocurre en el 99% de los folículos o la ovulación que es alcanzada por unos pocos. El tiempo requerido para que un folículo primordial complete su desarrollo hasta la ovulación es de aproximadamente 180 días (21).

El crecimiento y la maduración folicular representan una sucesión de transformaciones celulares y moleculares de diversos componentes del folículo: el ovocito, las células de la granulosa y la teca están regidas por señales hormonales (23). Por consiguiente la reserva de folículos en el ovario atraviesa por tres etapas de desarrollo: primaria prenatal, secundaria o antral y preovulatoria (16).

2.1.3 Folículos primordiales

El desarrollo inicial del folículo implica el crecimiento del ovocito, se sintetiza gran cantidad de Ácido ribonucleico (ARN) (24). Histológicamente un folículo primordial contiene al ovocito rodeado por células foliculares planas o células pre granulosas (epitelio folicular) (20). Estos folículos se caracterizan por que no son dependientes de gonadotropinas. Por lo que el desarrollo inicial o la activación de su estado de aquiescencia para unirse a pool de folículos en crecimiento aún se desconocen (24), (25). Hay estudios en roedores que han demostrado que el inicio del crecimiento y proliferación de los folículos está determinado por el antígeno nuclear proliferante (PCNA) una proteína expresada por los folículos primordiales en crecimiento (25).

2.1.4 Folículos primarios y secundarios

Los folículos primordiales que contenían células epiteliales planas alrededor del ovocito cambian a células cuboides y empiezan a proliferar generando un epitelio estratificado que posteriormente se llamara células de la granulosa. Así mismo el ovocito primario empieza a crecer y aumentar su diámetro (26). El siguiente estadio se denomina folículo secundario en el que prolifera las células de la granulosa y forman varias capas que rodean al ovocito. Los folículos primordial y secundario comprenden aun el estadio pre antral (21).

2.1.5 Folículo terciario, antral

El folículo terciario se caracteriza por la formación de la teca interna y externa. Además, comienzan a formarse espacios entre las células de la granulosa, estos espacios confluyen más tarde en una cavidad llamada antro folicular que aumentará de tamaño. El líquido presente en esta cavidad se llama líquido folicular que contiene esteroides, glucoproteínas, ácido hialurónico, etc (23). El folículo pre ovulatorio está en la capacidad de ovular (16).

2.2 Biotecnologías de la reproducción animal

Las biotecnologías de reproducción asistida en animales domésticos han logrado importantes avances en las últimas décadas, favorecidos por el avance tecnológico, la utilización de medios de cultivo sintéticos y una mejor comprensión de los procesos fisiológicos que ocurren en los ovocitos y embriones de diferentes especies (2). Este es el caso de la producción de embriones *in vitro* (PIV) a partir de ovocitos de bovino, una tecnología utilizada por varias compañías comerciales en todo el mundo y con fines investigativos. Aunque se usa ampliamente en bovinos, la PIV todavía tiene algunos factores limitantes, esto hace que los resultados aún este lejos de ser óptimos (27).

2.3 Producción *in vitro* de embriones (PIV)

2.3.1 Reseña histórica de la producción de embriones *in vitro*

En el año de 1959, el conejo fue la primera especie mamífera de la cual se obtuvieron crías vivas mediante fecundación *in vitro* (FIV). Posteriormente en 1968 se desarrolló en ratones de laboratorio y finalmente la primera FIV exitosa

en el ganado bovino se efectuó en el año de 1977 cuando los espermatozoides fueron capacitados en el oviducto y útero de una coneja. El primer ternero vivo mediante esta biotecnología nace en 1987, cuando un embrión de 4 células se transfirió al oviducto de una vaca receptora (1).

Sin embargo, el cultivo *in vitro* de los ovocitos fecundados desde su inicio constituyó un problema metodológico (28). Los embriones bovinos en desarrollo se interrumpían en el estadio de 8-16 células, por ello al principio se emplearon medios de cultivo *in vivo* en los cuales los cigotos se cultivaban en oviductos de ovejas, conejas y vaquillonas; posteriormente aparecieron los cultivos celulares y a partir de ese momento la investigación en los procedimientos de PIV han crecido notablemente (29).

2.3.2 Ventajas y desventajas de la PIV con ovarios de animales faenados

La PIV es una biotecnología que tienen múltiples ventajas ya que permiten la recuperación de un alto número de ovocitos de vacas genéticamente valiosas, incluso cuando estos animales han terminado su vida productiva (30), la optimización del uso de semen de alto valor genético, la creación de bancos de gametos de animales seleccionados, entre otras (31). No obstante, un pequeño porcentaje de los embriones producidos *in vitro* pueden presentar trastornos en el metabolismo intracelular y mayor incidencia de anomalías cromosómicas(32) que se traducen en mortalidad embrionaria, anormalidades fetales en el desarrollo, dificultades en la crioconservación de embriones a largo plazo (33). Y sobre todo la gran dificultad de esta biotecnología es el éxito limitado de los ovocitos en transformarse en embriones de calidad debido a la baja competencia de desarrollo (3).

2.3.3 Factores que afectan la calidad de los ovocitos para la PIV

Uno de los factores de gran importancia para la producción de embriones bovinos en el laboratorio es la capacidad del ovocito para someterse a la fertilización y convertirse en un embrión transferible, esto se conoce como competencia de los ovocitos (34).

Existen muchos factores que influyen en la calidad de los ovocitos, es por ello que las investigaciones a lo largo de los últimos años han pretendido idear las formas o estrategias en las que se puedan identificar ovocitos de buena calidad (35). Algunas de las características asociados con los ovocitos menos competentes pueden ser visibles de inmediato, mientras otras pueden no ser evidentes hasta la fertilización del ovocito (2).

a. Edad del animal

La edad de los animales de los que se obtiene los ovarios para la aspiración de ovocitos para la producción *in vitro* de embriones es una constante preocupación debido a variabilidad de la calidad de los ovocitos recuperados de animales muy jóvenes o muy viejos (17). Se ha revelado por ejemplo que los ovocitos provenientes de novillas tiene bajas tasas de fecundación, clivaje y formación de blastocistos, relacionado sobre todo a la menor capacidad para madurar a metafase II (36);(37).

b. Categoría del ganado, ciclo estral

La etapa del ciclo estral también juega un papel importante. Está comprobado que los ovocitos de mayor calidad se pueden obtener de ovarios que poseen un cuerpo lúteo (38). Por otro lado, se ha demostrado que la competencia de desarrollo de los COC's está influenciada por la presencia de un folículo dominante (FD) en uno o ambos ovarios, el mismo que ejerce un efecto negativo sobre la calidad de los demás folículos. (39)

c. Morfología del ovario

La evaluación morfológica del ovario es un método útil para predecir el potencial de desarrollo de los ovocitos bovinos *in vitro*. Los ovarios con folículo dominante con diámetro mayor de 10 mm o con más de 10 folículos de 2-5 mm normalmente son de calidad inferior que aquellos ovarios que no poseen FD y que tienen menos 10 folículos, con o sin cuerpo lúteo (2).

El entorno intraovárico al que están expuestos los ovocitos puede desempeñar un papel importante en la determinación de su competencia para el desarrollo,

por ello es importante la clasificación y selección previa del diámetro folicular de aquellos folículos en los que se realizara la aspiración (30).

d. Condición corporal y nutricional

La condición corporal y el estado nutricional del ganado son otros de los factores que afectan la calidad de los ovocitos. Es conocido que las vacas con baja condición corporal 1-2 en una escala 1-5, tienen significativamente menor proporción de ovocitos de buena calidad comparado con el ganado en buenas condiciones; por lo tanto, vacas en buena condición nutricional deberían ser seleccionadas siempre que sea posible (40).

Por otra parte, el régimen nutricional también podría afectar la calidad de los ovocitos sobre todo por exceso de energía dietética, el balance energético negativo luego del parto debido a la acción tóxica de los ácidos grasos no esterificados en los folículos y ovocitos (40),(41). Incluso hay evidencia que sugiere que diferentes niveles nutricionales pueden afectar la expresión de genes importantes para el desarrollo de los embriones (42).

e. Factor animal

El mérito genético del ganado afecta la calidad de los ovocitos. Las vacas de alta producción de leche poseen ovocitos de menor calidad en comparación con los animales de mérito genético medio (40). Estos resultados justifican las bajas tasas de fertilidad de algunas ganaderías lecheras de alto rendimiento (43).

Pero además este factor incluye la individualidad propia de cada animal o el potencial intrínseco de cada individuo, atributo que siempre es diferente a los demás animales del hato (2).

f. Factores ambientales

Existe amplia evidencia que muestra que el estrés por el calor de verano en las zonas tropicales, subtropicales, y templadas afecta la calidad de los ovocitos y las temperaturas elevadas afectan el desarrollo temprano de los embriones (44).

2.3.4 Evaluación de la calidad de los ovocitos

A lo largo de los últimos años se han propuesto algunos sistemas utilizados para la clasificación de los ovocitos bovinos. Existen muchos factores asociados a la calidad, tales como la morfología de los COC's, el número de capas de las células del cúmulus, el diámetro del ovocito, la coloración del citoplasma del ovocito (45), el tamaño del espacio perivitelino (46), el grosor y la organización de la zona pelúcida (47), la distribución mitocondrial y la actividad de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (3). La mayoría de estos métodos dependen de una evaluación subjetiva por parte del personal del laboratorio y por lo tanto puede variar según la perspectiva del individuo (48).

a. Evaluación morfológica de los ovocitos

El fundamento de la evaluación morfológica se basa en la observación de las características visibles de los ovocitos mediante el uso de un estereoscopio, considerando la compactación y cantidad de las células del cúmulus, la homogeneidad del citoplasma y la integridad de la zona pelúcida (45).

La clasificación morfológica determina que existe 4 categorías de COC's: 1.) A=ovocito de apariencia compacta, con más de 3 capas de células del cúmulus oophorus, citoplasma granular uniforme y transparente que le da una apariencia polvorienta; 2.) B=ovocito con 1 a 3 capas de células del cúmulus que no rodean completamente al ovocito, con citoplasma opaco, total o parcialmente homogéneo y finamente granulado; 3.) C=ovocitos totalmente desnudos, encerrados solo por la zona pelúcida, y/o citoplasma vacuolado, fragmentado con zonas oscuras irregulares y 4.) D=ovocitos deformados con células de la granulosa que cubren parcial o totalmente la zona pelúcida o completamente expandidos con células del cúmulus disperso y descolorido (49);(50).

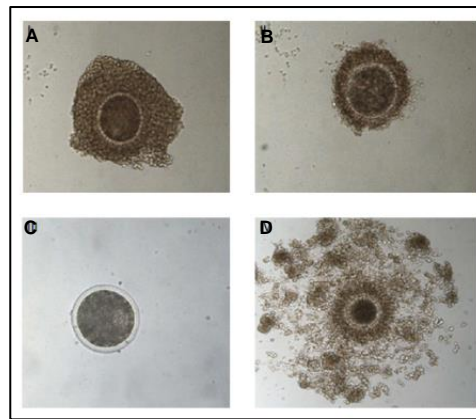


Gráfico 1: Clasificación morfológica de los COC's

Fuente: Hopper, (1)

En la vida práctica, la evaluación morfológica es la más usada para seleccionar la calidad de los ovocitos, considerando que es el método más rápido que evita un retraso excesivo en la colocación de los ovocitos en el medio de maduración (2).

b. Diámetro de los ovocitos y zona pelúcida

Otra forma de clasificar a los ovocitos de acuerdo a su calidad se basa en la evaluación de su diámetro. Se sabe que la capacidad del ovocito bovino para reanudar y completar la meiosis *in vitro* está relacionada con su tamaño. Los ovocitos menores de 110 μm de diámetro tienen una capacidad reducida para reanudar la meiosis (51). Los ovocitos pequeños por lo tanto tienden a seguir un camino anormal de la maduración meiótica, lo que resulta en trastornos en el proceso de maduración y como consecuencia un potencial de desarrollo reducido de los embriones derivados de pequeños ovocitos (52).

La zona pelúcida (ZP) de los mamíferos es una capa extracelular que rodea ovocitos en crecimiento, ovocitos ovulados y embriones tempranos. La ZP tiene varias funciones, tales como la unión de espermatozoides de una manera específica a la especie, bloqueando la polispermia, previniendo la dispersión de blastómeros durante el desarrollo preimplantacional, facilitando el paso del embrión a través del oviducto y protegiendo el embrión durante las primeras etapas de desarrollo (53). La disociación de la ZP de la membrana plasmática provoca el formación del espacio perivitelino (PVS) (54).

c. Prueba del azul brillante de cresilo

La prueba de tinción mediante el Azul Brillante de Cresilo (BCB) es un método no invasivo que permite la selección de los ovocitos competentes para la maduración en un grupo de ovocitos con diámetros heterogéneos (7). La prueba BCB determina la actividad intracelular de la glucosa-6-fosfato-desidrogenasa (G6PDH), una enzima componente de la pentosa fosfato que proporciona en el ciclo de la ribosa fosfato la síntesis de nucleótidos y NADPH, pero disminuye gradualmente su actividad según los ovocitos alcanzan su fase de crecimiento (55);(7);(56);(57).

La pérdida de la expresión de G6PDH se asocia con ovocitos que alcanzan competencia de desarrollo, estos ovocitos no pueden descomponer enzimáticamente la tinción BCB y manchan positivamente (BCB+), mientras que los ovocitos que no han alcanzado la competencia son incoloros (BCB-) debido a la continua expresión de G6PDH que descompone la tinción (58); (59).

Estudios realizados en bovinos, porcinos, cabras y ovejas (60);(12);(61);(7);(62); establecen que la tinción BCB puede constituir una prueba complementaria a la evaluación visual de las características morfológicas, como el grosor y la compacidad de las células del cúmulus y la homogeneidad del ooplasma oscuro para la selección de ovocitos y la obtención de un mayor porcentaje de embriones (63). Los resultados de estas investigaciones determinan que los ovocitos BCB+ tienen generalmente un mayor diámetro, son más competentes para la maduración, y el porcentaje de desarrollo de mórula y blastocisto se incrementa significativamente en comparación con ovocitos BCB- (63).

Consideraciones de la efectividad de la tinción BCB

Se ha determinado que los ovocitos competentes por la tinción o BCB+ en varios de los estudios han alcanzado porcentajes significativos de blastocistos superior a los ovocitos BCB- y los no expuestos a la tinción (3);(7);(10);(11).

Sin embargo, existen algunos estudios que han informado que la tinción con BCB puede ejercer efectos adversos. En ovocitos porcinos se ha demostrado que la solución de BCB cambia los niveles de ARNm y proteínas que son responsables de una fertilización exitosa (64) y puede inducir aberraciones cromosómicas (8);

incluso estudios recientes no recomiendan la aplicación de tinción con BCB en la selección de ovocitos porcinos debido a una similitud relativamente alta en la maduración *in vitro* de BCB + y los ovocitos de control (8).

Un estudio llevado a cabo en el 2008 con ovocitos bovinos no encontraron diferencia significativa en las tasa de blastocistos entre ovocitos BCB+ y Control (sin exposición a BCB), además estos autores evidenciaron que los ovocitos sometidos a tinción con BCB mostraron tendencia a la apoptosis ya que el nivel de transcripción de genes relacionados con la apoptosis en los ovocitos BCB+ era significativamente mayor en comparación con los ovocitos no teñidos (4).

Todos estos resultados han puesto en discusión el uso y la efectividad del Azul brillante de cresilo como prueba para determinar la competencia del ovocito, incluso aumentan la posibilidad de que la tinción con BCB sea tóxica para los ovocitos (64).

d. Ultra estructura de los ovocitos y genes expresión

La ultraestructura de los ovocitos, la presencia de vesículas lipídicas, la concentración individual de 17b-estradiol dentro del líquido folicular y la expresión genética son otras de las técnicas que podría en un futuro permitir predecir la competencia de desarrollo de los ovocitos y facilitar el desarrollo de medios de maduración y cultivo apropiados (65);(66).

La concentración de los constituyentes del líquido folicular como progesterona y 17b-estradiol también pueden ser útiles para evaluar la calidad del ovocito. Se espera que los folículos sanos con ovocitos de buena calidad muestren concentraciones altas de estradiol (<100 pg / ml) y progesterona baja (39).

2.4 Protocolo de producción de embriones *in vitro*

La producción *in vitro* de embriones es una biotecnología reproductiva que consta de 4 etapas: 1) Colección de los ovarios bovinos procedentes de matadero para la obtención de complejos cúmulus-ovocitos (COC's); 2) Maduración *in vitro* (MIV); 3) Fecundación *in vitro* (FIV); y 4) Cultivo *in vitro* de embriones (CIV),(67);(68).

2.4.1 Colección de los ovarios bovinos procedentes de matadero

La recolección o recuperación de COC's bovinos a partir de ovarios de vacas y vaquillonas sacrificadas constituye una de las formas de producir embriones. Los ovarios poseen varios folículos en diferentes estadios de crecimiento, con ovocitos en desarrollo (69).

Es considerado el método de recuperación de ovocitos bovinos más eficiente para preservar los recursos genéticos mediante la producción de embriones *in vitro* y sobre todo de aquellos animales de alto potencial productivo sacrificados por problemas no relacionados con la reproducción (67);(20). Sin embargo, también puede realizarse a partir de animales vivos mediante aspiración guiada por ultrasonido (OPU) que permiten obtener ovocitos en varias ocasiones (31).

Por otra parte, hay considerar los protocolos actuales para la producción de embriones *in vitro* exigen la utilización de métodos que faciliten la recuperación de varios ovocitos de buena calidad por ovario; por lo tanto, el número de ovocitos recuperados tiene una variación dependiendo del método de recolección y el número de folículos ováricos presentes, que está relacionado al estado del ciclo ovárico al momento del faenamiento (2).

2.4.2 Transporte de ovarios de matadero

Los ovarios son transportados al laboratorio en solución buffer fosfato salina (PBS) a temperaturas de 24 a 25 °C, lo que permite su conservación hasta 11 horas sin que los ovocitos pierdan o disminuyan la capacidad de ser fecundados, ni el posterior desarrollo de los embriones (20). La primera actividad dentro del laboratorio es el lavado de los ovarios por tres veces en el medio de PBS, luego se procede a obtener los ovocitos mediante aspiración folicular (29).

2.4.3 Almacenamiento de los ovocitos y su relación con la calidad

Esta determinado que la capacidad de desarrollo de los ovocitos bovinos puede mejorarse manteniendo condiciones cálidas de temperatura durante el transporte (2). Los estudios sugieren que los ovarios deben mantenerse a una temperatura de almacenamiento de aproximadamente 25-30 °C durante 3 a 4 horas después del sacrificio, obteniendo una mejora significativa en la competencia para el desarrollo de los ovocitos. (48).

2.4.4 Aspiración de ovocitos

La recuperación de ovocitos antrales utilizando dispositivos como jeringas y agujas ha sido el método más comúnmente empleado con ovarios de ganado bovino provenientes del matadero. Una de las dificultades que inicialmente se asoció con esta técnica de aspiración radica en el hecho de que los ovocitos solo se pueden recuperar de un 30 a 60% de los folículos perforados; además en cuanto a la calidad de los ovocitos podría ser inferior comparada al método “slicing” o disección; sin embargo, en la vida práctica la recuperación de ovocitos depende en gran medida de la experticia del operador (20);(1).

Antes de proceder con la aspiración de los folículos ováricos el laboratorio debe estar aséptico y con los equipos e instrumentos preparados. Se limpia y se desinfecta las superficies de trabajo con alcohol de 70°. Además, se alistan los medios, el Baño María y se enciende la placa térmica (70).

Los folículos bovinos que poseen un diámetro entre 2–8 mm son puncionados y aspirados con agujas de calibre 18–22 g y jeringas de 5–20 ml (71). La aspiración también puede realizarse con equipos de aspiración con presión negativa conectadas a una bomba de vacío con presiones de 75–100 mmHg (20). Un estudio realizado por Perea, *et al.* (70), en el que evaluaron la calidad y maduración de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero con tres presiones de vacío 50 mmHg, 65 mmHg y 80 mmHg determinaron que la tasa de recuperación de ovocitos fue estadísticamente similar entre tratamientos, pero el porcentaje de ovocitos clase A y B recuperados fue mayor con las presiones (mmHg) más bajas (70).

2.4.5 Maduración de ovocitos (MIV)

La maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos inmaduros se produce mediante un mecanismo diferente a partir de los ovocitos madurados *in vivo*. La remoción de los ovocitos del ambiente folicular y el subsecuente traslado a condiciones de cultivo favorables da como resultado una maduración espontánea sin la serie fisiológica de eventos que ocurren *in vivo*, aunque es posible observar algunos cambios morfológicos como la expansión de las células del cúmulus (2); (72).

En el animal vivo este proceso ocurre en respuesta al aumento de la hormona luteinizante (LH) preovulatoria e implica cambios bioquímicos en el núcleo y en la organización del citoplasma, convirtiéndole a los ovocitos inmaduros en ovocitos maduros receptivos al proceso de fertilización y competentes para el desarrollo embrionario (72); (73). Este fenómeno de acontecimientos se simula en el laboratorio a través de los medios de maduración y se conoce como maduración *in vitro* (74).

La maduración exitosa para la PIV depende de calidad de los ovocitos o material de partida. Las cuatro categorías de COC's descritas anteriormente, tienen muy diferentes posibilidades para la maduración y el desarrollo de embriones (29).

2.4.5.1 Expansión de las células del cúmulus

Durante la fase final de la maduración del ovocito las células del cúmulus segregan ácido hialurónico (AH) un glucosaminoglucano no sulfatado que se une a las células del cúmulus por proteínas enlazadoras (2). El AH hidrata los espacios entre las células del cúmulus, estos a su vez se agrandan y las células quedan embebidas en matriz mucificada. Este proceso se denomina expansión de cúmulus o mucificación y es visible en los procedimientos de maduración *in vitro* luego de 24 horas (75);(76).

2.4.5.2 Maduración nuclear

La maduración de los ovocitos en las especies mamíferas ocurre desde días previos a la ruptura del folículo y la ovulación. El ovocito dentro el folículo mediante la señal hormonal ejercida por la oleada de LH reanuda la profase de meiosis I (MI) que estuvo detenida desde el nacimiento, progresando a metafase II (MII) de la segunda división meiótica, finalmente cuando el folículo alcanza el estadio preovulatorio termina su crecimiento, experimenta su maduración final y alcanza un diámetro igual o mayor a 110 μm (77) (78).

La maduración nuclear del ovocito bovino comienza con la ruptura de la vesícula germinal (GVBD), esto implica la síntesis de proteínas activas durante las primeras 8 horas de cultivo (74). La GVBD se caracteriza por la condensación gradual de la cromatina, la desaparición del nucléolo compacto y la desintegración de la membrana nuclear (79).

No obstante, la maduración de los ovocitos o transición de MI a MII se desencadena y se regula mediante la acción coordinada de dos quinasas, el factor promotor de la maduración (MPF) y la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), esta última es necesaria para la detención de la metafase II, y la organización del huso meiótico (80).

La meiosis progresa, los cromosomas se condensan, se agrupan y se acomodan en la placa ecuatorial del huso meiótico y el ovocito experimenta su primera división meiótica con la extrusión del primer cuerpo polar en el espacio perivitelino (74). El ovocito, ahora denominado ovocito secundario, comienza la segunda división meiótica y continúa hasta llegar a Metafase II (81). La segunda división meiótica no se completa a menos que se produzca la penetración de los espermatozoides o que el ovocito responda a un estímulo de activación (2). La finalización de la segunda división meiótica se acompaña de la extrusión del segundo cuerpo polar en el espacio perivitelino. El ovocito en esta etapa contiene el número haploide de cromosomas; Todo el proceso de maduración se completa en aproximadamente 24 horas (74).

2.4.5.3 Maduración citoplasmática

La maduración citoplasmática incluye un complejo de reacción moleculares, síntesis de macromoléculas biológicas, activación de vías metabólicas y la redistribución extensa de orgánulos intracelulares, comenzando desde la alineación de los gránulos corticales a lo largo del oolemma (membrana vitelina), el reordenamiento de las mitocondrias para ocupar una ubicación perinuclear, el almacén de lípidos, la movilización del calcio de sus reservas internas y la reducción del compartimento de Golgi, eventos que son muy relevantes para la competencia de desarrollo del ovocito bovino (76);(82).

2.4.5.4 Maduración de los ovocitos en el laboratorio y determinación a través de tinción Hoechst

Bajo el microscopio, el primer signo obvio de la reanudación de la meiosis es la disolución de la membrana nuclear (GVBD). La extrusión del primer cuerpo polar (PB) y la formación del segundo huso meiótico ocurren posteriormente a medida

que el ovocito madura y las células del cúmulo circundante experimentan expansión (2).

Hoechst 33342 es un colorante fluorescente que tiene la capacidad de unirse a las moléculas de ADN lo que permite la identificación del estado de maduración nuclear de los ovocitos luego de su exposición al microscopio de fluorescencia (83); (84). El colorante es excitado por la luz ultravioleta con una longitud de onda cercana a 350 nm y emiten fluorescencia azul/cian de 461 nm (85). Esta tinción fluorescente permite diferenciar diferentes estadios de maduración nuclear del ovocito: vesícula germinal (GV), ruptura de vesícula germinal (GVBD), metafase I (MI) y metafase II (MII) (86).

2.4.5.5 Medio de maduración *in vitro*

El medio de maduración para el cultivo de ovocitos inmaduros durante 24 horas es el *Tissue Culture Medium 199* (TCM-199), el medio más tradicional y exitosamente empleado que está suplementado con suero fetal que contiene 10% Albumina Sérica Bovina (BSA), 100 µg/ml de Piruvato de Sodio, 0,75 mg/ml de L-Glutamina, gonadotropinas 4 µg/ml de FSH-p (Folltropin®, Bioniche, Canadá), 2 µg/ml de Estradiol y 250 µg/ml de Gentamicina a una temperatura de 38.5°C en una atmósfera con 5% CO₂ en aire (16).

2.4.6 Fertilización *in vitro* (FIV)

La fertilización *in vitro* denominada también como inseminación, es el procedimiento por el cual los ovocitos maduros son cultivados con los espermatozoides para facilitar el proceso de fecundación (16). Comprende una serie de eventos cuyo objetivo final es la fusión de los núcleos de ambas gametas y la formación del genoma del nuevo individuo (2). El tiempo de fecundación es de 20-24 horas bajo las mismas condiciones de cultivo que durante la maduración de los ovocitos (1).

Durante el periodo de FIV, las células espermáticas se someten al proceso de capacitación, incrementando la motilidad y el vigor (20). Los agentes capacitivos como la heparina permitirán una mayor fluidez de la membrana al realizar la reacción acrosomal y unir la zona pelúcida a la aparición de la fertilización (23). Con la ocurrencia de la fertilización los cigotos comienzan su desarrollo (16).

La penetración del espermatozoide activa la segunda división meiótica con la expulsión del segundo corpúsculo polar (72).

2.4.6.1 Medio de fertilización

El medio de FIV consiste en Fert-TALP (tyrode-albumina-lactato-piruvato), que está compuesto por un conjunto de sales fisiológicas, albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos (BSA-FAF), piruvato, PHE (penicilamina, hipotaurina y epinefrina), heparina y sulfato de amikacina (68).

2.4.6.2 Capacitación espermática

Antes de la FIV los espermatozoides deben ser capacitados (2). La capacitación espermática es importante debido a que si el espermatozoide no está completamente capacitado cuando se añade a los ovocitos, el proceso de fertilización demora muchas horas, lo que origina el envejecimiento del ovocito antes de la fertilización (1). Los ovocitos envejecidos están expuestos a sufrir anomalías del desarrollo (7).

La capacitación espermática es la condición fisiológica que deben cumplir los espermatozoides para adquirir su potencial fecundante, penetrar las células del cúmulus y poder fecundar al ovocito luego de la reacción acrosómica (5),(39); cuyo proceso *in vivo* se logra por la interacción de las células espermáticas con los “factores capacitantes” que se encuentran en el tracto reproductivo femenino luego de la eyaculación (16).

Desde el punto de vista bioquímico la capacitación espermática comprende la eliminación de glucoproteínas adheridas a la membrana de los espermatozoides, la entrada de calcio dentro del acrosoma, cambio de la composición lipídica de la membrana espermática, cambio del pH interno, aumento de la permeabilidad y del metabolismo celular; todos estos cambios bioquímicos se traducen en un aumento de la motilidad individual progresiva de los espermatozoides (5);(87).

Las células espermáticas luego que se someten al proceso de capacitación incrementan en el patrón de motilidad, y vigor por acción de los agentes capacitivos presentes en el medio de fertilización como el PHE (penicilamina, hipotaurina y epinefrina)(16). Estos componentes juntos con la heparina

permitirán una mayor fluidez de la membrana al realizar la reacción acrosomal y unión a la zona pelúcida (68).

2.4.6.3 Preparación del semen previo a la fertilización *in vitro*

La preparación del semen tiene por objetivos separar los espermatozoides del líquido seminal y del diluyente, además obtener espermatozoides con un mínimo de 70% de motilidad rectilínea progresiva (16).

2.4.6.4 Centrifugación en gradiente de densidad.

El método de gradiente de densidad se basa en el principio de la sedimentación y depende de una solución, cuya densidad se incrementa desde la zona superior a la inferior. El semen con los espermatozoides es suspendido suavemente en la parte superior del gradiente, configurando una fina banda (16).

La centrifugación en gradiente permite que los espermatozoides se desplacen por los gradientes de densidad hasta que alcanzan un punto en el que su densidad y la del gradiente son idénticas, que es el límite para que no se produzca una sedimentación posterior; por lo tanto, los espermatozoides móviles y con acrosoma intacto que son los de mayor densidad no se quedan retenidos en las bandas de menor densidad y van al fondo del tubo (88).

La utilización de Percoll permite seleccionar espermatozoides según su motilidad, para ello se prepara concentraciones o columnas de 90 %, 60% y 30% o 45 % y 90% diluidas en medio de capacitación. Se centrifuga en tubos Eppendorf de 1,5 ml durante 10 minutos a 700 gravedades (89).

Con la selección de los espermatozoides, las microgotas del medio fertilización que contienen a los ovocitos maduros se inseminan con la concentración de 1 a 2×10^6 espermatozoides por ml (68).

2.4.7 Cultivo *in vitro* (CIV)

El cultivo *in vitro* (CIV) de embriones constituye el último paso en el proceso de PIV. Comprende aproximadamente 7 días de cultivo luego de la FIV, es decir desde la etapa de cigoto de 1 célula hasta el punto final de la etapa de blastocisto (2).

El medio más común para cultivar embriones bovinos es el fluido oviductal sintético (SOF) suplementado con aminoácidos y bajos niveles de suero con la finalidad de satisfacer las necesidades nutricionales de los embriones. Este medio se basó originalmente en el análisis bioquímico del fluido oviductal de ovino (16). Su composición busca imitar las necesidades metabólicas y el requerimiento energético que los cigotos y embriones encuentran a medida que se desplazan hacia los oviductos y hacia el útero durante los primeros 6 o 7 días de desarrollo. El sistema de cultivo de embriones además incluye una temperatura de 38,5°C, atmósfera humidificada de 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂ (1).

Se han diseñado muchos tipos diferentes de sistemas de cultivo *in vitro* para embriones mamíferos. Estos sistemas de CIV son denominados "definido", "semi-definido" o "No definidos". Los sistemas de cultivo definidos son aquellos en los que todos los componentes pueden definirse químicamente y no se incluyen productos como el suero y BSA (Bovine Serum Albumin) (2).

Los sistemas semi-definidos son aquellos en los que cada componente está químicamente definido con la excepción del BSA. Los sistemas no definidos incluyen componentes tales como el suero, que es una mezcla de biomoléculas que estimulan el desarrollo de las células y el crecimiento de los embriones. Además, contiene proteínas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas, etc. en cantidades variables. Sin embargo, la desventaja de estos sistemas de cultivo es el riesgo de contaminación microbiana, especialmente viral (49).

Por otra parte, existen sistemas de medios "secuenciales", donde los componentes cambian de acuerdo con los requisitos de los embriones, tienen la ventaja de disminuir la acumulación tóxica de amonio producidas por el metabolismo y degradación de los aminoácidos y reducen las tensiones producidas por cambios ambientales (1).

Finalmente, la evaluación del desarrollo *in vitro* es empleada como una medida numérica del desarrollo de los embriones. Estos valores son expresados en forma de tasas o proporciones de embriones que alcanzaron los diferentes estadios entre el día 1 luego de la fecundación y el día 7. Estos estadios son mórulas y blastocistos (16).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Materiales Biológicos

- Ovarios bovinos
- Pajuelas de semen bovino

3.1.2 Materiales Químicos

- Colorantes
 - Azul brillante de cresilo (Brilliant Cresyl Blue for clinical diagnosis: C.I. 51010)
 - Fluorocromo Hoechst (bisBenzimide H 33342 trihydrochloride for fluorescence -Sigma ®)
- Medios de maduración, fertilización y cultivo.
- Medios de fijación: Glicerol, Glutaraldehido 2%, Esmalte.
- H-SOF: Fluido oviductal sintético suplementado con Hepes.
- Aceite de cultivo de embriones (Mineral oil for cell culture-Sigma ®)
- Agua ultrapura (Water for embryo transfer sterile-filtered-Sigma ®)
- PBS: Solución buffer fosfato de Dulbecco (VIGRO® Complete Flush)
- Suero fisiológico: Cloruro de sodio 0.9%
- Hialuronidasa (H3506-Sigma®)
- Percoll (P1644-Sigma®)
- Alcohol 70%

3.1.3 Instrumental de Laboratorio

- Jeringas de dos piezas de 5-10 ml
- Agujas hipodérmicas 21 G
- Tubos Falcon de 10 y 50 ml
- Tubos Eppendorf de 1,5 y 2 ml
- Pipetas mecánicas
- Pipetas Drummond

- Puntas de pipetas
- Cajas Petri de búsqueda con cuadriculado
- Cajas Nunc de 4 pocillos
- Mini cajas de cultivo de 25 mm
- Laminas portaobjetos
- Laminas cubreobjetos
- Vasos de precipitación
- Mandil, cofia y guantes de nitrilo

3.1.4 Materiales de campo

- Termo de transporte
- Equipo de cirugía
- Toallas desechables
- Overol, botas, guantes

3.1.5 Equipos

- Estereoscopio
- Microscopio óptico
- Microscopio de fluorescencia
- Mini centrifuga
- Estufa de CO₂
- Cámara de cultivo Trigas
- Cámara de flujo laminar
- Cámara de Neubauer
- Platina de calefacción
- Baño María
- Adaptador de lente microscopio AmScope

3.2 Métodos

3.2.1 El área de estudio

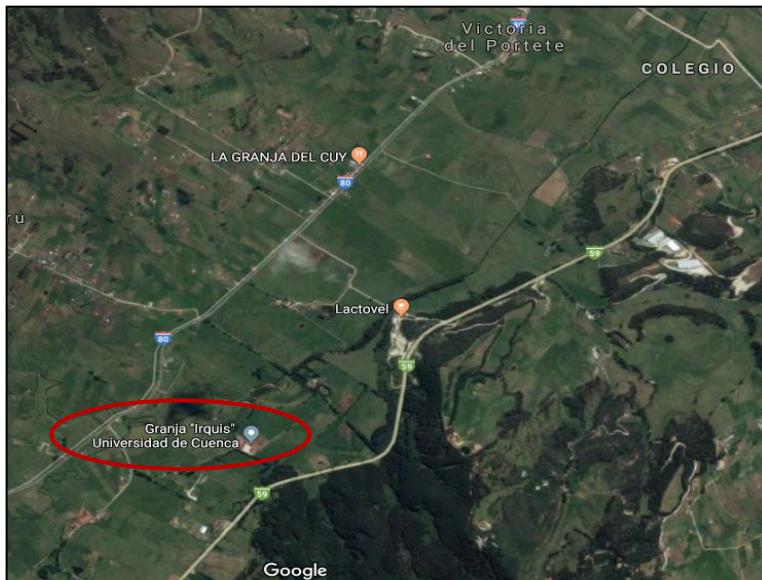


Gráfico 2: Ubicación del Laboratorio de Biotecnología en la Granja Irquis

Fuente: Directorio cartográfico de Google Maps, 2019.

3.2.2 Ubicación política-geográfica

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca ubicada en la Granja de Irquis, área que se encuentra en la jurisdicción política de la provincia del Azuay, cantón Cuenca, parroquia Victoria del Portete cuyas coordenadas son Latitud sur: 4°48.34"S y Longitud Oeste 79° 4'30.12"O; altitud de 2671 m.s.n.m.; pluviosidad anual entre 800 mm y 2000 mm, humedad relativa del 80% y temperaturas que entre 12 y 18 °C.

3.3 Unidad Experimental

Las unidades experimentales fueron 2.340 complejos cumulus ovocitos (COC's), bovinos provenientes de 388 ovarios de matadero, recuperados por aspiración folicular realizada de forma manual con el uso de una jeringa.

Los complejos cumulus ovocitos seleccionados para el experimento, fueron de categoría A y B de acuerdo a la escala descrita por Hawk & Wall (66), provenientes de folículos entre 2-8 mm, que se aspiraron máximo tres horas post mortem.

3.4 Metodología de la Investigación experimental

3.4.1 Recolección de ovarios, aspiración folicular y obtención de COC's

Los ovarios fueron recolectados en el Camal Municipal de Cuenca (EMURPLAG EP) dos veces vez por semana hasta completar 200 ovocitos por cada grupo experimental (G1, G2 y G3). Estos fueron transportados en solución fisiológica a temperatura entre 25-35°C, hasta el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal ubicado en la Granja Irquis en un tiempo no mayor a tres horas.

En el laboratorio los tejidos adyacentes a los ovarios (cuernos uterinos, ligamentos, segmentos de oviducto, etc.) fueron removidos con una tijera cuidando de no romper los folículos de la superficie. Inmediatamente los ovarios fueron lavados con Cloruro de sodio al 0,9% estéril, atemperado a 37,5°C, tres veces hasta que el contenido líquido se observó completamente cristalino.

Después del lavado los ovarios fueron secados con papel absorbente, el cual previamente se impregnó con alcohol. Posteriormente, cuidando la cadena de temperatura, se procedió a la punción de los folículos que median entre 2-8 mm, con una aguja de calibre 21G acoplada a una jeringa de 10 ml de dos cuerpos.

El líquido aspirado fue depositado directamente en un tubo Falcón de 15 ml atemperado a 35 - 37 °C. Una vez completada la aspiración folicular, se esperó 15 minutos para que los COC's (complejos cúmulos ovocitos) alcancen el fondo cónico del tubo Falcon, para luego aspirar el pellet con una pipeta Pasteur.

El pellet o sedimento se colocó en una placa de búsqueda de 95 mm², se realizó un extendido en un área aproximada de 3 a 4 cm², luego se procedió a identificarlos y transferirlos a gotas de medio H-SOF (fluido oviductal sintético suplementado con Hepes) para su posterior clasificación, según los criterios descritos en la sección siguiente.

3.4.2 Clasificación de los COC's

La placa con los COC's fue llevada a un estereoscopio para realizar la búsqueda, selección y clasificación de los COC's, de acuerdo al criterio descrito por Hawk

& Wall (66), y modificado por Samaniego *et al.* (50), quienes luego de la selección inicial agruparon los COC's en aptos (Tipos A y B) y no aptos (Tipos C), (**Tabla 1**). Los COC's fueron lavados tres veces en gotas de 100 μ L de medio H-SOF con el fin de librarlos de detritos tisulares, coágulos, etc.

Tabla 1: Clasificación morfológica de los COC's

Hawk & Wall (1994)			Samaniego et al., 2017
Tipo de ovocito	Características del cúmulus	Características del ovocito	Tipo de ovocito
Calidad Buena (A)	Compacto, con varias capas de células, con granulosa adherida ; el citoplasma se ve claramente	Homogéneo denso y finamente granulado.	Aptos (Tipo A y B)
Calidad Intermedia (B)	Grueso, usualmente con granulosa adherida, pero el citoplasma no se ve claramente; cúmulo compacto, con pocas a varias capas, cubriendo al menos la mitad de la zona pelúcida	Rango desde homogéneo denso y finamente granulado a granulado de tamaño moderado.	
Rechazados (C)	Parcial o completamente expandido con cúmulo disperso, falta de células con presencia de material extracelular, cúmulo descolorido (café claro o muy oscuro); corona radiata sin cúmulo; ovocitos desnudos	Granulado grueso o con mezcla de áreas muy claras o muy oscuras; citoplasma descolorido (café claro u oscuro); ovocitos deformes.	No aptos (Tipo C)

Evaluación de la calidad de los ovocitos (COC's), según lo descrito por Hawk & Wall (66) y la modificación realizada por Samaniego et al. (50)



Una vez clasificados y seleccionados los COC's aptos de cada sesión o repetición, se tomaron al azar el 33% y fueron identificados como Grupo 1 o Testigo: (G1). Al 66% de los COC's restantes se sometieron a la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB) para determinar la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa. Los BCB+ fueron colocados en el grupo 2 (G2) y los BCB- en el grupo 3 (G3).

3.4.3 Tinción de los COC's mediante Azul brillante de cresilo

Para llevar a cabo la tinción, los COC's fueron lavados 3 veces en PBS de Dulbecco modificado por la adición de 0,4% de BSA (mDPBS). Previamente se preparó en un tubo eppendorf la concentración estándar 26 μ M del BCB. Se diluyó 2,4 μ l de la solución stock del BCB con 1000 μ l de medio mDPBS.

La tinción BCB preparada se homogenizó en el vortex y se colocó en una caja Petri en gotas de 50 μ l, inmediatamente los COC's fueron puestos en las gotas del colorante BCB 26 μ M diluido en mDPBS. Posteriormente, la caja Petri fue llevada a la cámara de CO₂ por 90 minutos a 38,5°C en atmósfera humidificada.

Cumplido el tiempo, se sacó la caja Petri de la cámara de CO₂ y los COC's fueron lavados tres veces en gotas de medio H-SOF para realizar la evaluación de los mismos, determinando que los ovocitos que no tiñeron su citoplasma se les consideró BCB negativos (BCB-), y los teñidos como BCB positivos (BCB+), todo esto basado en la metodología descrita por Catala *et al.* (90).

3.4.4 Determinación de la morfometría de los COC's inmaduros

Se tomaron un 25% de COC's de cada grupo de estudio (G1, G2, G3) y en gotas separadas fueron expuestos a un medio compuesto por Hialuronidasa (Sigma) en concentración de 1mg/ml (p/v) por dos minutos, luego se procedió a denudar los ovocitos de las células del cúmulus por acción mecánica ejercida al pipetear varias veces el medio con los ovocitos.

Una vez denudados, los ovocitos de cada grupo fueron colocados en gotas separadas de 50 μ l de H-SOF sobre una lámina portaobjetos y se evaluó la morfometría mediante un software (AmScope V.3.7) calibrado para realizar mediciones en micras, el cual funciona con una cámara de alta definición (Excelis AU-600-HD) acoplada a un microscopio provisto con un lente 10x.

Se determinaron 5 medidas morfométricas de los ovocitos según la metodología de Ueno *et al.* (46).

- Diámetro total del ovocito: medida en línea recta de dos puntos de la circunferencia del ovocito sin considerar la zona pelúcida y expresada en micras (μm).
- Volumen del ovocito: Determinado mediante la fórmula $\frac{4}{3} (\pi)$ (radio del ovocito)³ y expresado en micras cúbicas (μm^3).
- Diámetro del citoplasma: medida en línea recta de dos puntos de la circunferencia del citoplasma y expresada en micras (μm).
- Espacio perivitelino: Determinado mediante la fórmula: diámetro del ovocito - diámetro del citoplasma / 2 expresada en micras (μm).
- Espesor de la zona pelúcida: Grosor o anchura de la zona pelúcida expresada en micras (μm).

3.4.5 Maduración *in vitro* (MIV)

El 75% de los COC's de cada grupo experimental fueron lavados dos veces en medio MIV y colocados en el medio de maduración previamente estabilizado.

- a) Medio de Maduración. Consistió en TCM 199 suplementado con 10% de Albumina Sérica Bovina (BSA), 100 $\mu\text{g/ml}$ de Piruvato de Sodio, 0,75 mg/ml de L-Glutamina, 4 $\mu\text{g/ml}$ de FSH-p (Folltropin®, Bioniche, Canadá), 2 $\mu\text{g/ml}$ de Estradiol y 250 $\mu\text{g/ml}$ de Gentamicina.
- b) Maduración. Se realizó en 3 microgotas de 50 μl por placa Petri de 25 mm, en cada una de las cuales se colocaron 10 a 12 COC's seleccionados de cada grupo experimental, luego fueron incubados en una estufa de CO_2 al 5%, Humedad del 90% y 38.5 °C de temperatura por 18-24 horas.

Luego de cumplirse 24 horas en el medio de maduración, los COC's de los tres grupos fueron observados bajo una lupa estereoscópica para observar la expansión de las células del cúmulus.

3.4.6 Evaluación de la morfometría post maduración

De cada uno de los grupos de COC's madurados (G1, G2 y G3), se seleccionó aleatoriamente el 25% para determinar la morfometría post maduración,

siguiendo la misma metodología y las medidas evaluadas antes de la maduración.

3.4.7 Evaluación de la progresión de la meiosis luego de la MIV

Para la evaluación de la progresión de la meiosis o determinación del estado de maduración nuclear se utilizó los mismos ovocitos empleados previamente en la evaluación de la morfometría post maduración.

Para realizar este procedimiento los ovocitos fueron colocados en cajas de cultivo de 4 pocillos y sometidos al proceso de tinción cuyos medios son preparados previamente los cuales consisten en: a.) Medio de fijación: 750 μ l de H-SOF y 250 μ l de Glutaraldehído 2%; b.) Fluorocromo Hoechst: 1000 μ l de H-SOF y 5 μ l de Hoechst stock (33342, Sigma); c.) Medio de montaje: 1000 μ l de H-SOF, 1000 μ l de Glicerol y 1000 μ l de Hoechst stock.

El Medio de fijación se dividió para los tres grupos (G1, G2 y G3) y se colocó en los pocillos en un volumen de 300 μ l, luego se añadió los ovocitos en cada uno de los grupos y se esperó 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los ovocitos de los tres grupos fueron lavados en 200 μ l de H-SOF en una nueva caja nunc durante 5 minutos. Posteriormente, los ovocitos fueron llevados a nuevos pocillos que contenían 300 μ l del Fluorocromo Hoechst donde fueron expuestos durante 10 minutos en un ambiente oscuro. Finalmente, se lavó los ovocitos de los tres grupos en medio H-SOF.

Inmediatamente se preparó las láminas portaobjetos, se dibujaron círculos a lado inverso de las placas y dentro de los mismos se colocaron 2 μ l de Medio de montaje. Se añadieron 2-3 ovocitos en cada uno de los círculos, se colocó suavemente un cubreobjetos y se selló los bordes con esmalte.

Las placas se dejaron secar a temperatura ambiente para luego ser observadas en el microscopio invertido con sistema de fluorescencia. Esto permitió determinar si los ovocitos se encontraban en estado de vesícula germinal (GV), rotura de vesícula germinal (GVBD), metafase I (MI), metafase II (MII; primer corpúsculo polar) y degenerados (Dg).

3.4.8 Fecundación *in vitro* (FIV)

Después de la MIV, el 75% restante de COC's fueron lavados tres veces en el medio de fertilización (TALP, 6) y transferidos inmediatamente a gotas de 50 μ l de medio de fertilización suplementado con 2 μ g/ml de heparina y PHE (penicilamina, 20 μ M, hipotaurina, 10 μ M, epinefrina, 1 μ M). La inseminación se llevó a cabo añadiendo 1×10^6 espermatozoides/ml a cada microgota. Los ovocitos se incubaron con los espermatozoides durante 22-24 horas a 38,5°C y 5% de CO₂ en atmósfera de aire humidificado.

3.4.9 Cultivo *in vitro* (CIV)

Transcurridas 24 horas luego de la fertilización los presuntos cigotos fueron desnudados, para ello se colocó en un tubo Falcón de 15 ml con H-SOF, y en este se depositaron los ovocitos, con el fin de ser desnudados mediante acción mecánica en el vortex por 2 min. Posteriormente fueron lavados en medio H-SOF e incubados en grupos de 10-15 en microgotas de 50 μ l de medio de cultivo Cit-SOF (fluido oviductal sintético suplementado con citrato), a 38,5°C, en una atmósfera humidificada, 5% de CO₂ y 5% de O₂.

El clivaje se evaluó 48 horas después de haber realizado la fertilización *in vitro*, mediante observación de aquellos ovocitos que presentaron división (blastómeros).

La valoración del número de embriones que se desarrollaron al estado de blastocisto se realizó en el día 7 y 8.

3.5 Diseño experimental

El trabajo fue de tipo experimental, con dos tratamientos y un testigo, se aplicó un diseño completamente al azar (DCA).

Grupo 1: Testigo o Control (clasificación tradicional de COC's) basada en morfología y número de capas de las células del cúmulus, la homogeneidad del citoplasma y la integridad de la zona pelúcida.

Grupo 2: COC's clasificados tradicionalmente y que resultaron positivos a la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB+).

Grupo 3: COC's clasificados tradicionalmente y que resultaron negativos a la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB-).

Variables:

Independientes:

- Estado metabólico del ovocito de acuerdo a la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa determinado mediante la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB) como método de clasificación de COC's competentes (BCB+) y no competentes (BCB-) para la PIV.
- La sesión de aspiración folicular.

Dependientes:

- Morfometría de ovocitos inmaduros
- Porcentaje de maduración de COC's
- Morfometría de ovocitos maduros
- Porcentaje de clivaje de ovocitos fecundados *in vitro*
- Porcentaje de blastocistos

3.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico SPSS® versión 25. Se obtuvieron estadígrafos principales. Para la determinar diferencias significativas entre tratamientos se realizó un ANOVA, para comparar medias se ejecutó la prueba de Tukey al 5%, para comparar la maduración nuclear y morfológica se utilizó la prueba T de student; para la comparación de porcentajes entre tratamientos se utilizó la prueba de Chi cuadrado al 5%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Recuperación de COC's

Se procesó un total de 388 ovarios de matadero en 13 sesiones, obteniendo 2.340 COC's (promedio de 6,0 COC's/ovario). Este promedio es superior al reportado por Singh *et al.* (91) que obtuvo 2,1 COC's/ovario; sin embargo la recuperación en ganado tipo *Bos indicus* alcanza un promedio de 10,9 COC's/ovario según Kouamo *et al.* (92).

4.2 Clasificación morfológica de COC's

Un numero de 1.758 COC's (75,1%) fueron clasificados en forma convencional como COC's de categoría A y B (aptos) de acuerdo a la morfología de las células del cumulus, homogeneidad del citoplasma e integridad de la zona pelúcida. Este porcentaje fue superior a los obtenidos por Estrella *et al.* (71) quienes determinaron un 66% de los COC's aptos provenientes de folículos de 4-8 mm. Por el contario, Perea *et al.* (70) empleando una presión en la bomba de aspiración de 65 mmHg obtuvieron porcentajes mayores (88,7%) evidenciando que la presión de aspiración influye en la variación del porcentaje de COC's aptos obtenidos.

4.3 Prueba del Azul brillante de cresilo

De los 1.758 COC's clasificados como aptos para la PIV, 1.158 fueron tomados aleatoriamente y sometidos a la prueba del Azul brillante de cresilo (BCB). Los 600 COC's restantes fueron considerados como grupo Testigo o Control e incubados bajo las mismas condiciones sin exposición al BCB.

En el grupo de COC's sometidos a la tinción con BCB, se observó que un 62,3% fueron BCB+ y un 37,7% BCB- (**Tabla 2**).

Tabla 2: Actividad de la G6PDH en ovocitos inmaduros sometidos a BCB.

<i>n</i> COC's	BCB+ <i>n</i> (%)	BCB- <i>n</i> (%)
1158	721 (62,3)	437 (37,7)

El porcentaje de ovocitos BCB+ (62,3%) obtenido en este trabajo empleando la concentración 26 μM del BCB, fue similar a los reportados por Karami *et al.* (63) en estudios con ovocitos bovinos 56,3%; por Alm *et al.* (3) 57,9%; por Silva *et al.* (11), 65%; pero difiere a los encontrados por Pujol *et al.* (10) que obtuvieron un 66,5% quienes seleccionaron ovocitos de novillas (7-11 meses) y evaluaron COC's categoría A, B y C. Igualmente, Opiela *et al.* (4) determinaron un porcentaje mayor (70%) a pesar que se utilizó la misma concentración del BCB; sin embargo, los ovocitos fueron expuestos por 60 minutos a la incubación con el BCB, lo cual podría explicar la diferencia entre los resultados.

4.4 Morfometría de los ovocitos antes y después de la MIV

La evaluación de la morfometría del ovocito antes y después de la MIV consideró 5 variables: el diámetro total del ovocito (sin incluir ZP), el volumen, el diámetro del citoplasma, el tamaño del espacio perivitelino y el espesor de la zona pelúcida.

Se evaluó la morfometría de 338 ovocitos antes de la maduración *in vitro*, 124 correspondieron al grupo Control o Testigo (G1), 124 al grupo BCB+ (G2) y 90 al grupo BCB- (G3). Posterior a las 24h de maduración *in vitro* (MIV), aleatoriamente se seleccionaron 358 ovocitos, de los cuales 133 pertenecían al grupo Testigo (G1), 132 al grupo BCB+ (G2) y 93 al grupo BCB- (G3).

4.4.1 Diámetro total del ovocito

Los ovocitos del grupo BCB+ (G2) antes (135,9 μm) y después (134,8 μm) de la MIV fueron significativamente más grandes en diámetro ($p < 0.05$) que los ovocitos del grupo BCB- (128,1 y 127,6 μm) y el grupo Testigo o Control (129,0 y 128,2 μm). (**Gráfico 3**). Sin embargo, no se evidenció diferencia significativa entre ovocitos del grupo Testigo y BCB- antes o después de la MIV.

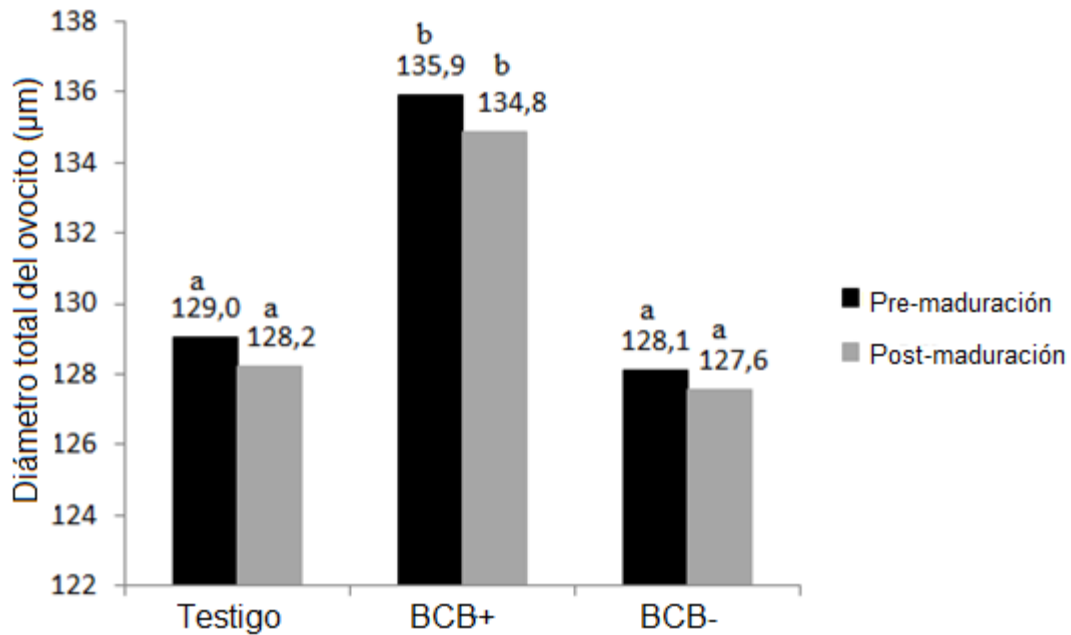
La media del diámetro de los ovocitos en los grupos BCB+ (G2) y BCB- (G3) fue menor a los reportados por Pujol *et al.* (10) quienes seleccionaron ovocitos en novillas de categoría A, B y C y determinaron 152,6 μm en el grupo BCB+ y 147,0 μm en el grupo BCB-, pero en ese estudio en particular para el cálculo del diámetro se incluyó a la ZP, por ello las diferencias de las medias comparadas con el presente ensayo son notables; sin embargo, los resultados del presente

estudio coincide que el grupo BCB+ fue de mayor tamaño. En otros animales como la cabra se determinó que los ovocitos BCB+ tenían un diámetro de 136,6 μm y los BCB- de 125,5 μm , siendo de mayor diámetro los BCB+ (9); igual tendencia se mostró en porcinos BCB+ (113,1 μm) y BCB- (100,3 μm), (93). Estas investigaciones demuestran que los ovocitos BCB+ son significativamente más grandes que aquellos que no tiñeron el citoplasma.

Por otro lado, el diámetro promedio de ovocitos bovinos provenientes de camal en el grupo testigo en el presente trabajo fue de 129,0 μm y 128,2 μm , antes y después de la MIV, muy similar a los encontrados por Argudo *et al.* (94), 126.4 μm y Alvarado, (95) 127.2 μm . Cabe agregar que el diámetro del ovocito bovino proveniente de folículos antrales tiene un amplio intervalo de 110 a 150 μm y su tamaño es un factor determinante para adquirir la competencia meiótica (81).

Además, la diferencia del diámetro de los ovocitos entre el grupo BCB+ y testigo encontradas en este estudio evidencian que la tinción BCB fue efectiva en la selección de ovocitos de mayor tamaño, con baja actividad de G6PDH y que terminaron el crecimiento.

Las comparaciones entre las medias de los diámetros antes y después de la maduración en todos los grupos demuestran que los ovocitos no incrementan su tamaño durante las 24 horas de MIV, por el contrario, lo reducen. Esto no debería ser sorprendente, ya que han sido evidenciado esta reducción en otros estudios, como el realizado por Mocha *et al.* (96), (124,1 μm a 121,1 μm); y Estrella *et al.* (71), con ovocitos provenientes de folículos de 4-8 mm (121,9 μm a 120,1 μm). Esto ratifica claramente que los ovocitos una vez extraídos del ambiente folicular no crecen, por lo que se hace relevante el tamaño del ovocito adquirido antes de los procesos de maduración *in vitro* para lograr una mejor competencia de desarrollo en los procesos de PIV.

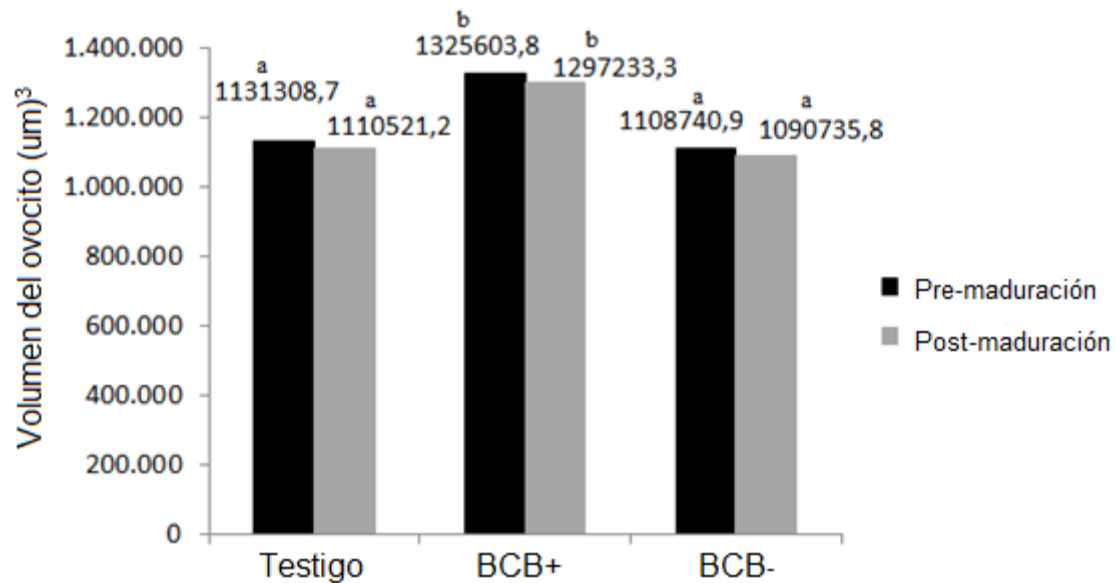


a b =letras diferentes indican diferencia entre grupos. Prueba de Tukey al 5%.

Gráfico 3: Promedio del diámetro total del ovocito en los tres tratamientos valorados pre y post maduración.

4.4.2 Volumen del ovocito

El volumen del ovocito físicamente tiene un comportamiento similar al diámetro. El grupo de ovocitos BCB+ ($1.325.603,8 \mu\text{m}^3$) fue estadísticamente mayor que el grupo testigo ($1.131.308,7 \mu\text{m}^3$) y BCB- ($1.108.740,9 \mu\text{m}^3$) antes y después de la MIV. Las comparaciones del volumen antes y después de la maduración entre los mismos grupos no fue significativa ($p > 0.05$), (**Gráfico 4**). Las medias del volumen de grupo testigo del presente estudio no difieren a los reportados por Argudo *et al.* (94), quienes obtuvieron una media de $1.072.322,5 \mu\text{m}^3$ en ovocitos provenientes de ovarios con cuerpo lúteo y $1.011.583,0 \mu\text{m}^3$ en ovocitos provenientes de ovarios sin cuerpo lúteo.



a b =letras diferentes indican diferencia entre grupos. Prueba de Tukey al 5%.

Gráfico 4: Promedio del volumen del ovocito en los tres tratamientos, valorados en pre y pos maduración.

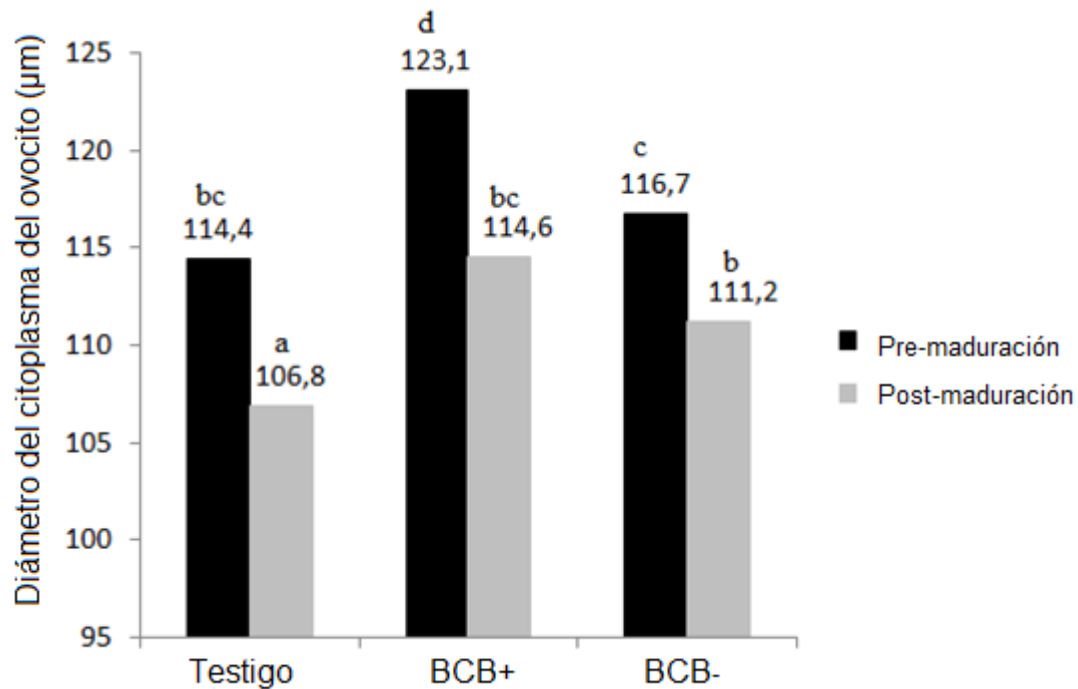
4.4.3 Diámetro del citoplasma del ovocito

La media del diámetro de citoplasma o también conocido como ooplasma del ovocito antes de la maduración (123,1 µm) fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en el grupo de ovocitos BCB+ en comparación con los ovocitos del grupo Testigo (114,4 µm) y BCB- (116,7 µm), estos dos últimos grupos no fueron diferentes ($p > 0,05$) (**Gráfico 5**).

La comparación de las medias del diámetro del citoplasma antes y después de la maduración *in vitro* entre los mismos grupos demostró que tanto los ovocitos del grupo Testigo, BCB+ y BCB- presentaron una disminución del diámetro del citoplasma y fue estadísticamente significativo en los tres grupos ($p < 0,05$).

A pesar de esto, el diámetro del citoplasma es un dato de la morfometría del ovocito bovino que no se conoce con exactitud y no ha tenido mucha importancia. Existen reportes hasta la fecha únicamente en animales de laboratorio: rata (75,9 µm y 67.7 µm) antes y después de la MIV (46); coneja (125,4 µm y 92.61 µm), (97). La comparación de los resultados del diámetro del citoplasma del presente

trabajo con ovocitos de otros animales evidencia que existe una marcada reducción, que visto de otra perspectiva es el aumento del espacio perivitelino.



a b =letras diferentes indican diferencia entre grupos. Prueba de Tukey al 5%.

Gráfico 5: Promedio del diámetro del citoplasma del ovocito en los tres tratamientos, valorados en pre y post maduración.

4.4.4 Tamaño de espacio perivitelino (PVS)

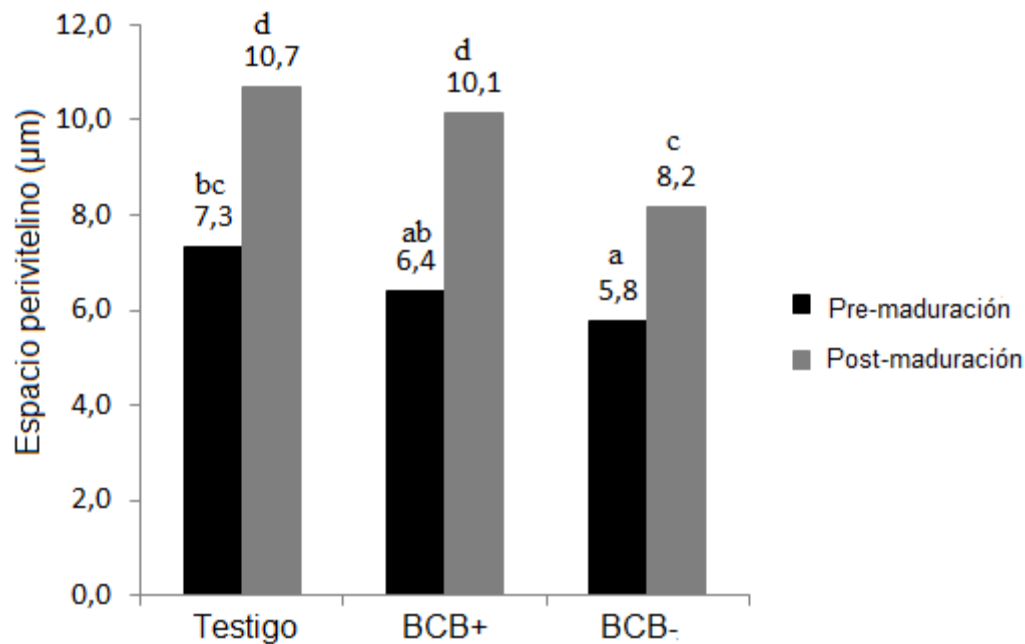
El tamaño del espacio perivitelino (PVS) está íntimamente relacionado al diámetro del citoplasma del ovocito.

La comparación de las medias del tamaño del PVS antes y después de la maduración *in vitro* dentro de los tres grupos fue significativa ($p < 0,05$). El grupo Testigo presento un tamaño de 7,3 µm antes de la MIV incrementando 24 horas después a 10,7 µm; en el grupo de ovocitos BCB+ el incremento fue de 6,4 µm a 10,1 µm, y el grupo BCB- el tamaño del PVS ascendió de 5,8 µm a 8,2 µm, este último grupo evidentemente fue el que menos incremento el tamaño del PVS comparado con el grupo Testigo y grupo BCB+ (**Gráfico 6**).

No existen reportes sobre tamaño del espacio perivitelino de ovocitos maduros e inmaduros en las principales especies mamíferas, las investigaciones solo han podido determinar en animales de laboratorio como ratas cuyo tamaño antes de la MIV fue de $0.28 \pm 0.07 \mu\text{m}$ y luego de 14 h de MIV fue de $5.40 \pm 0.11 \mu\text{m}$ (46); en conejas $0.12 \pm 0.07 \mu\text{m}$ y $9.68 \pm 0.44 \mu\text{m}$ antes y post MIV (97). Los resultados del presente estudio demuestran que en la especie bovina se mantiene la tendencia del incremento del espacio perivitelino luego del proceso de maduración *in vitro*.

La razón de este acontecimiento según estudios en animales experimentales (rata, coneja hámster) se debe a los glucosaminoglucanos, incluidos el ácido hialurónico (HA), que ocupan el espacio perivitelino y que es sintetizado por las células de cúmulus y atraviesan la ZP por canales de transporte. El HA es una molécula que tiene la capacidad de retener grandes volúmenes de agua, y cuando se acumula aumenta el espacio al absorber moléculas de H_2O , deshidratando el citosol del ovocito (54).

Además, algunos estudios han determinado que la reducción en el diámetro del citoplasma de los ovocitos con la maduración y el aumento del diámetro interno del espacio perivitelino es importante para disminuir la polispermia después de la fertilización *in vitro* (97). Los ovocitos con grandes espacios perivitelinos contienen mayores cantidades de proteínas, hialuronano, gránulos corticales y enzimas, sustancias con capacidad de obstruir físicamente el movimiento y la unión del esperma a la membrana plasmática de los ovocitos (46). Complementariamente, en humanos el tamaño el espacio perivitelino es considerado un importante criterio morfológico para la evaluación de la calidad de ovocitos después de la compactación del cúmulus, la coloración del citoplasma y el espesor de la ZP (47). De acuerdo con estos razonamientos, valdría considerar que en ovocitos de bovino el aumento del espacio perivitelino podría ser un marcador indirecto de la competencia ovocitaria, la maduración y el potencial de fertilización.



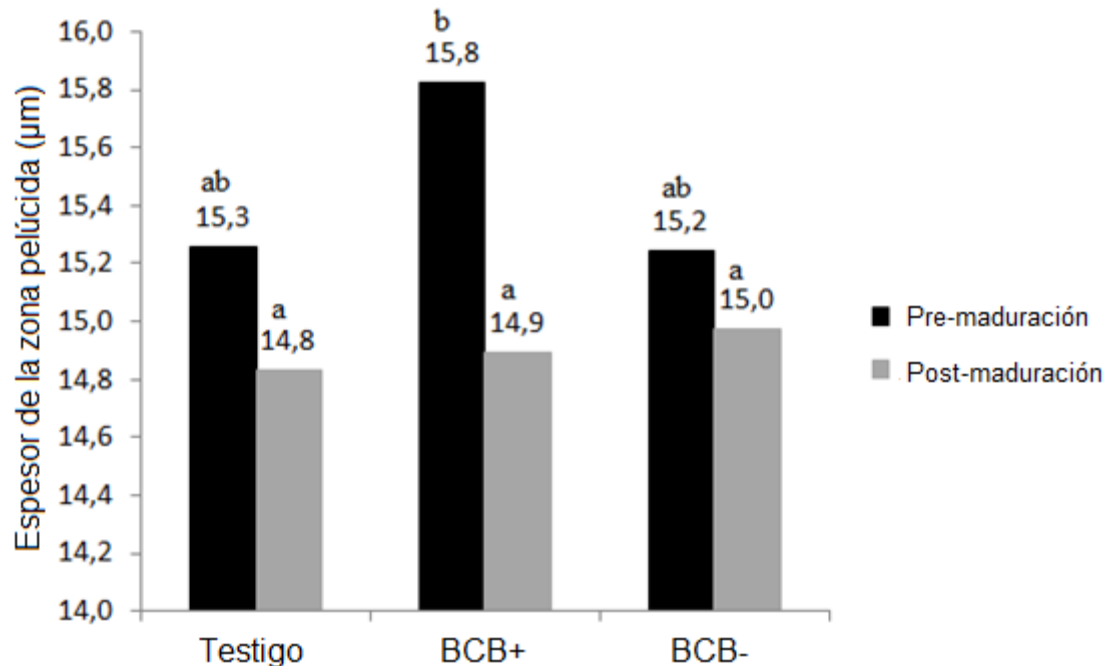
a b =letras diferentes indican diferencia entre grupos. Prueba de Tukey al 5%.

Gráfico 6: Promedio del espacio perivitelino del ovocito en los tres tratamientos, valorados en pre y post maduración.

4.4.5 Espesor de la zona pelúcida (ZP)

Las comparaciones de las medias del espesor de la ZP entre los tres tratamientos antes y después de la maduración fueron muy similares ($p > 0,05$), considerándose no significativas. La media del espesor de la ZP en el grupo testigo antes de la maduración fue de 15,3 µm y luego de la MIV 14,8 µm; en el grupo de ovocitos BCB+ 15,8 µm y 14,9 µm; finalmente en el grupo BCB- las medias fueron muy parecidas, antes de la maduración 15,2 µm y post maduración 15,0 µm. Estos resultados indican claramente que el grosor de la zona pelúcida tiene un parámetro de medida similar entre grupos, (**Gráfico 7**). Sin embargo, la ZP desde el punto de vista morfológico es otro indicador importante de la calidad de los ovocitos. En bovinos el espesor de la ZP es de 12-19 µm (98); humanos 10 - 31 µm (47). En el presente estudio a pesar que el diámetro medio de la ZP no varió significativamente entre tratamientos antes y después de la maduración *in vitro* ($p > 0,05$), la media en todos los grupos se encontró dentro del rango normal de ovocitos bovinos (98), considerando que en

la mayoría de las especies mamíferas los ovocitos se fertilizan mejor *in vitro* cuando el grosor de la ZP es inferior a 18,6 μm (47), ya que influye en la penetración del espermatozoides y el desarrollo embrionario (92).



a b =letras diferentes indican diferencia entre grupos. Prueba de Tukey al 5%.

Gráfico 7: Promedio del ancho de la zona pelúcida (ZP) en los tres tratamientos, valorados en pre y post maduración.

4.5 Maduración morfológica-Expansión de las células del cúmulus

Un número de 1.420 ovocitos fueron madurados *in vitro*, 476 pertenecieron al grupo Testigo (G1), 597 al grupo BCB+ (G2), y 347 al grupo BCB- (G3).

La valoración morfológica de la maduración de los ovocitos luego de 24 horas considerando la expansión de las células del cúmulus no difirió estadísticamente entre los tres tratamientos ($p > 0,05$); a pesar de eso el grupo Control o Testigo (88,2%) presentó un mejor porcentaje de maduración que el grupo BCB+ (86,8%) y BCB- (86,1%). La falta de diferencias significativas probablemente se debió a la subjetividad de la evaluación, ya que únicamente se realiza mediante observación visual. No obstante, esta forma de valoración es tradicionalmente

usada en la actualidad con fines investigativos o comerciales y se ha realizado desde hace muchos años, siendo el 80% el porcentaje de efectividad de maduración internacionalmente aceptado (6);(73), (**Gráfico 8**).

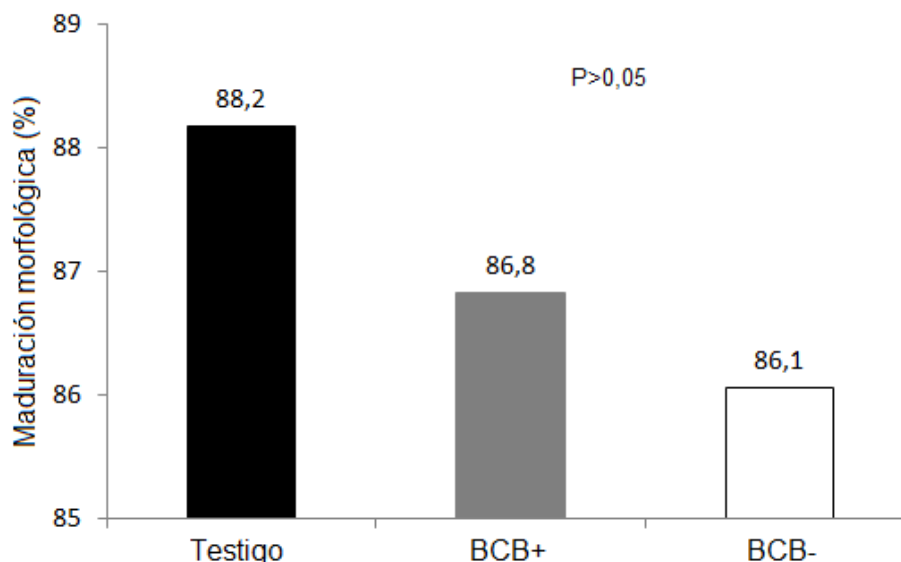


Gráfico 8: Porcentaje de maduración de los ovocitos en los diferentes tratamientos, determinada por el grado de expansión de las células de cúmulus (grado de musificación) Prueba de Tukey al 5%.

4.5.1 Maduración nuclear o progresión de la Meiosis

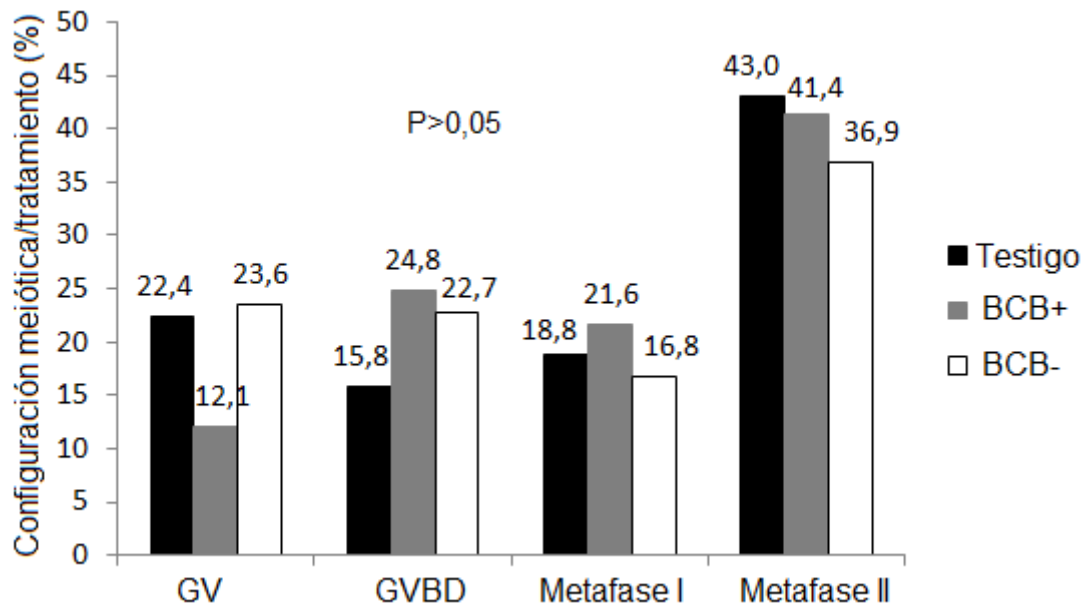
Para la evaluación de la progresión de la Meiosis o configuración de la cromatina se utilizaron el 25% de ovocitos que previamente fueron evaluados la morfometría luego de la maduración *in vitro*; pero se descartaron del estudio aquellos ovocitos que presentaron rotura de la zona pelúcida durante el proceso de denudación y aquellos ovocitos degenerados que no podían ser evaluados a través del microscopio de fluorescencia. Por lo tanto, para la evaluación del estado de maduración nuclear se utilizaron 249 ovocitos aptos de los cuales 82 pertenecieron al grupo testigo (G1), 96 correspondían al grupo de ovocitos BCB+ (G2) y 71 ovocitos fueron valorados del grupo BCB- (G3).

Los resultados de la configuración meiótica determinada en el grupo testigo (G1) fue 22,4% en estado de vesícula germinal (GV), 15,8% en rotura de vesícula germinal (GVBD), 18,8% en Metafase I (MI) y el 43,0 % en estado de metafase

II (MII). En el grupo BCB+ (G2) 12,1% de los ovocitos se encontraba en VG, 24,8 % en GVBD, 21,6% en MI y el 41 % en MII. Finalmente, el grupo BCB- (G3), 23,6% GV, 22,7% GVBD, 16,8% MI y 36,9% en MII con presencia de cuerpo polar.

Las comparaciones de las medias entre tratamientos en todos los estadios de configuración meiótica no fueron significativas ($p>0,05$); a pesar de que en el primer estadio de GV los ovocitos BCB+ presentaron la tasa más baja, lo que significa que menor número de ovocitos no reanudaron la meiosis; sin embargo, al finalizar su maduración nuclear completa los porcentajes de ovocitos que alcanzaron la metafase II son similares entre los tres tratamientos (**Gráfico 9**).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son similares a otros estudios en el que tampoco encontraron diferencias significativas en la proporción de ovocitos que alcanzaron la metafase II, Alm *et al.* (3), cuyos investigadores observaron porcentajes similares entre el grupo control (77,5%) y BCB+ (72,55%); sin embargo, los ovocitos BCB- en este mismo estudio tuvieron significativamente la tasa más baja en estadio de MII (58,1%) que los otros grupos (3). A pesar de eso, las tasas fueron mayores que las evidenciadas en el presente trabajo (Testigo: 43%, BCB+ 41%, BCB- 36,9%). Y como puedo observar en este trabajo, el grupo BCB- (36,9%) obtuvo la tasa más baja de maduración que probablemente se debió al crecimiento no finalizado de los ovocitos antes de la MIV y de la síntesis de ARNm reportados en algunos estudios (5). A este punto resulta oportuno reconocer que la maduración ovocitaria optima no solo depende del progreso a metafase II y la extrusión del cuerpo polar sino también la sincronización efectiva con la maduración citoplasmática complementado con un buen sistema de cultivo (76).

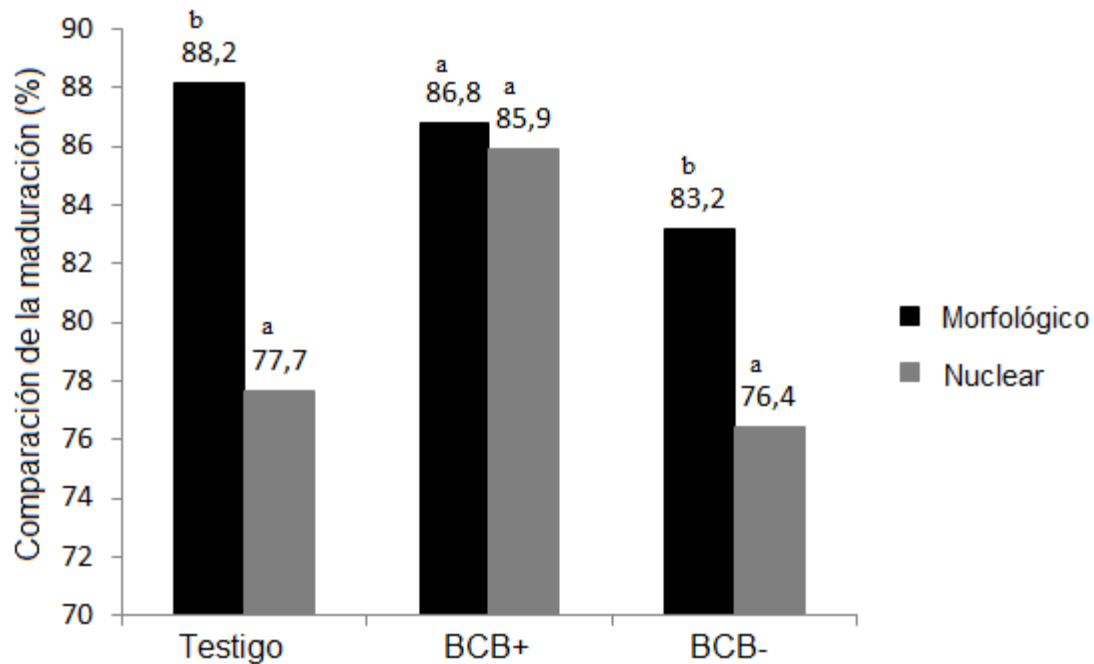


Prueba de Tukey al 5%. GV=vesícula germinal; GVBD=rotura vesícula germinal; metafase I; metafase II

Gráfico 9: Configuración meiótica de los ovocitos luego del proceso de maduración *in vitro* en los diferentes tratamientos.

4.5.2 Comparación de la maduración morfológica y nuclear

La comparación de la maduración morfológica y nuclear pone en evidencia la importancia de efectuar una evaluación objetiva. El porcentaje de maduración nuclear para cada tratamiento se obtuvo de la sumatoria de los tres estadios de configuración meiótica (GVBD, MI y MII) basado en la metodología de Majerus *et al.* (52). En el grupo testigo, la maduración evaluada morfológicamente fue del 88,2%; sin embargo, la maduración nuclear solo le atribuye un 77,7% cuya diferencia fue significativa dentro de este grupo ($p < 0,05$). En el grupo BCB+ la maduración evaluada morfológicamente fue 86,8%, mientras que la evaluación nuclear del 85,9%, en este grupo es evidente que la falta de diferencia significativa ($p > 0,05$), entre la maduración evaluada morfológica y nuclear se debe al efecto del uso del azul brillante de cresilo que permitió la selección de ovocitos competentes para la maduración. Finalmente, en el grupo de ovocitos BCB- la maduración evaluada morfológicamente fue del 83,2% pero la nuclear solo evidencio un 76,7% y fue significativa ($p < 0,05$) (**Gráfico 10**).



Prueba de T de Student. ab= letras diferentes indican diferencia estadística dentro de cada tratamiento

Gráfico 10: Comparación del grado de maduración morfológico (expansión de las células del cúmulus) vs maduración nuclear.

4.6 Desarrollo embrionario: clivaje y blastocistos

Un total de 1.062 ovocitos fueron fertilizados, pero debido a las pérdidas durante el proceso se consideraron 953 que realmente se utilizaron para la FIV y el desarrollo *in vitro* (CIV). De estos, 311 pertenecieron al grupo testigo (G1), 409 al grupo BCB+ (G2) y 233 al grupo BCB- (G3).

La evaluación del clivaje 48h posteriores a la FIV, determinó que el grupo testigo (43,4%) presento un porcentaje significativamente mayor que el grupo BCB+ (33,5%); sin embargo, no se encontró diferencia con el grupo BCB- (34,8%). (Tabla 3)

Esto evidencia claramente que el porcentaje del clivaje del grupo BCB+ se vio afectado por la exposición al azul brillante de cresilo, considerando que estos ovocitos al tener baja actividad de la enzima G6PDH no degradaron el colorante, reteniéndola en el citoplasma y núcleo. Estudios de Pawlak et al (8) y Wongsrikeao et al (12) han identificado que la exposición de ovocitos al BCB

produce daños en el ADN y anormalidades cromosómicas, y como consecuencia puede afectar el clivaje y el desarrollo de embriones *in vitro*. Por el contrario, el grupo BCB- al mantener alta actividad de G6PDH degradó el colorante, por lo tanto, el efecto nocivo en los ovocitos fue reducido. Esto explicaría la falta de diferencias entre los grupos BCB+ y BCB-.

No obstante, la falta de diferencias significativas en la tasa de clivaje entre grupos ya fue evidenciada por Silva *et al.* (11) quienes obtuvieron el 75% de clivaje en los tres tratamientos. Alm *et al.* (3), también evidenciaron tasas de clivaje similares en los tres grupos (Control 67,4%; BCB+ 72,8%; y BCB- 71,6%). Al igual que Mota *et al.* (27) Control (65,3%) y BCB+ (64,4%) y Bhojwani *et al.* (56) Control 73%, BCB+ 78%.

Tabla 3: Tasa de clivaje de ovocitos fertilizados de los diferentes grupos.

Grupo de ovocitos	Ovocitos para FIV	Ovocitos clivados	
	<i>n</i>	<i>n</i>	%
Testigo	311	135	43,4% ^b
BCB+	409	137	33,5% ^a
BCB-	233	81	34,8% ^{ab}

Prueba de Chi cuadrado al 5%. Valores en la misma columna con diferentes letras (a,b,c) = diferencia significativa ($p < 0,05$).

Con respecto al porcentaje de blastocitos observados en el día 8 luego de la FIV, el grupo Testigo obtuvo una tasa de 19,3%, el grupo BCB+ 24,8% y el grupo BCB- 13,6%. Los tres grupos no fueron estadísticamente diferentes. ($p > 0,05$) (Tabla 4).

La falta de diferencias significativas en la tasa de blastocitos entre el grupo testigo y BCB+ del presente estudio coincide con los resultados encontrados por Mota *et al.* (27) (BCB+ 18,5% y Control 16,3%). Opiela *et al.* (4) también evidenciaron que el porcentaje de blastocitos entre el grupo BCB+ (14,2%) y el grupo Control (13,2%) no son diferentes; además, determinaron que los ovocitos sometidos a tinción BCB tuvieron tendencia a la apoptosis por la expresión

significativa de genes apoptóticos (Bax y Bcl-2) en comparación con el grupo testigo no expuesto a la tinción.

Sin embargo, el porcentaje total de embriones combinados mórulas y blastocistos en el presente estudio determinó que el grupo BCB+ (52,6%) obtuvo el porcentaje más alto que el grupo testigo (32,6%) y BCB- (30,9%). Esto demuestra claramente que a pesar de que los porcentajes de clivaje del grupo BCB+ y BCB- fueron similares, el grupo BCB+ fue el más competente para superar el desarrollo embrionario temprano, que es el periodo más crítico de la producción *in vitro* de embriones.

Tabla 4: Tasa de desarrollo embrionario de los diferentes grupos.

Grupo de ovocitos	Ovocitos para FIV	Ovocitos clivados	Blastocistos		Mórulas		Total de embriones	
	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	% /clivados	<i>n</i>	% /clivados	<i>n</i>	% /clivados
Testigo	311	135	26	19,3 ^a	18	13,3 ^a	44	32,6 ^a
BCB+	409	137	34	24,8 ^a	38	27,7 ^b	72	52,6 ^b
BCB-	233	81	11	13,6 ^a	14	17,3 ^{ab}	25	30,9 ^a

Prueba de Chi cuadrado al 5%. Valores en la misma columna con diferentes letras (a,b,c) = diferencia significativa ($p < 0,05$).

5. CONCLUSIONES

- Los ovocitos sin actividad de la enzima G6PDH (BCB +) tienen un mayor tamaño y volumen antes y después de la maduración *in vitro*, así como, mayor espacio perivitelino después de la MIV en comparación con el grupo BCB-.
- El grado de actividad positiva (BCB+) o negativa (BCB-) de la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH) presente en los ovocitos luego de ser colectados del folículo, no influye sobre el porcentaje de maduración *in vitro* morfológica o nuclear.
- La prueba del Azul brillante de cresilo (BCB) determina poblaciones con diferentes competencias de desarrollo embrionario, aunque no permite aumentar el clivaje y el número de blastocistos, pero si el porcentaje global de embriones (mórulas y blastocistos) obtenidos *in vitro*.

6. RECOMENDACIONES

- Con fines investigativos se puede realizar los mismos procedimientos de evaluación de la competencia de ovocitos bovinos en animales vivos que reúnan la condiciones y criterios de homogeneidad tanto en el estado de salud y condición general de los animales, como el estado reproductivo para garantizar una buena fuente de ovarios para la obtención de complejos cumulus ovocitos.
- Para reducir el efecto de las alteraciones y daños de los ovocitos se puede efectuar pruebas con diferentes concentraciones y tiempos de incubación con la tinción BCB que permita determinar la concentración y el tiempo óptimo para la identificación de ovocitos competentes.
- Estudiar y evaluar el ADN de los ovocitos luego de la exposición al BCB para conocer de manera más específica las alteraciones y los cambios estructurales que afectan el desarrollo *in vitro*.
- Finalmente se sugiere que la tinción Azul brillante de cresilo podría usarse más con fines investigativos que con fines comerciales en la producción *in vitro* de embriones. El enfoque para mejorar las tasas de embriones en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Universidad de Cuenca debe estar dirigido a controlar los sistemas de cultivo, composición de los medios, calibración de equipos e instrumentos y el entrenamiento o capacitación del personal para la realización de estos procedimientos en cada una de las etapas del protocolo.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Hopper R. Bovine reproduction. 1st ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2015.
2. Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. 2nd ed. Molecular and Cellular Biology. Wallingford: CABI Publishing; 2003.
3. Alm H, Torner H, Löhrke B, Viergutz T, Ghoneim IM, Kanitz W. Bovine blastocyst development rate *in vitro* is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology*. 2005;63(8):2194–205.
4. Opiela J, Katska-Ksiazkiewicz L, Lipiński D, Słomski R, Bzowska M, Ryńska B. Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and developmental competence following IVP in cattle. *Theriogenology*. 2008;69(5):546–55.
5. Fair T, Hyttel P, Greve T. Bovine oocyte size in relationship to follicular diameter, maturational competence and rna synthesis. *Theriogenology*. 1995;43:209.
6. Blondin P, Coenen K, Guilbault LA, Sirard MA. *In vitro* production bovine embryos: Developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology*. 1997;47(5):1061–75.
7. Catalá MG, Izquierdo D, Uzbekova S, Morató R, Roura M, Romaguera R, et al. Brilliant Cresyl Blue stain selects largest oocytes with highest mitochondrial activity, maturation-promoting factor activity and embryo developmental competence in prepubertal sheep. *Reproduction*. 2011;142(4):517–27.
8. Pawlak P, Warzych E, Chabowska A, Lechniak D. Differences in cytoplasmic maturation between the BCB+ and control porcine oocytes do not justify application of the BCB test for a standard IVM protocol. *J Reprod Dev*. 2014;60(1):28–36.
9. Rodríguez-González E, López-BeÁjar M, Velilla E, Paramio MT. Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology*. 2002;57(5):1397–409.
10. Pujol M, López-Béjar M, Paramio MT. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology*. 2004;61(4):735–44.
11. Silva DS, Rodriguez P, Galuppo A, Arruda NS, Rodrigues JL. Selection of bovine oocytes by brilliant cresyl blue staining: Effect on meiosis progression, organelle distribution and embryo development. *Zygote*. 2013;21(3):250–5.
12. Wongsrikeao P, Otoi T, Yamasaki H, Agung B, Taniguchi M, Naoi H, et al. Effects of single and double exposure to brilliant cresyl blue on the

- selection of porcine oocytes for *in vitro* production of embryos. *Theriogenology*. 2006;66(2):366–72.
13. Motta Delgado PA, Ramos Cuéllar N, González Sánchez CM, Rojas Castro EC. Dinámica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina. *Vet y Zootec*. 2011;5(2):88–99.
 14. Smith P, Wilhelm D, Rodgers RJ. Development of mammalian ovary. *J Endocrinol*. 2014;221(3).
 15. McGeady TA, Quinn PJ, FitzPatrick ES, Ryan MT. *Veterinary Embriology*. Iowa: Blackwell; 2006. 364 p.
 16. Palma G. *Biotecnología de la reproducción*. 2nd ed. Mar del Plata: INTA; 2008.
 17. Duby RT, Damiani P, Looney CR, Fissore RA, Robl JM. Prepuberal calves as oocyte donors: promises and problems. *Theriogenology*. 1996;45(1):121–30.
 18. Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Malhi P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*. 2008;69(1):72–80.
 19. Rippe C. El ciclo estral. *Dairy Cattle Reprod Conf*. 2009;(March 2015):111–6.
 20. Brito Capallejas R. *Fisiología de la reproducción animal con elementos de biotecnología*. 2nd ed. La Habana: Editorial Félix Varela; 2009. 253 p.
 21. Fernández Á. Dinámica folicular : funcionamiento y regulación. *Sitio Argentino Prod Anim*. 2003;5(1):8–12.
 22. Gasque R. *Enciclopedia Bovina*. Mexico: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM; 2008.
 23. Hafez ES., Hafez B. *Reproducción e Iseminacion artificial en animales*. 7th ed. Mexico D.F: Mc Graw- Hill Interamericana; 2002.
 24. Cunningham JG, Klein BG. *Fisiología Veterinaria*. Barcelona: Elsevier España; 2014.
 25. Wandji SA, Srsen V, Voss AK, Eppig JJ, Fortune JE. Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. *Biol Reprod*. 1996;55(5):942–8.
 26. Araújo VR, Gastal MO, Figueiredo JR, Gastal EL. *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014;12:78.
 27. Mota GB, Tavares Pereira R, Serapiao R, Cortes M, Moreira Viana H, Alves Torres C, et al. Developmental competence and expression of the MATER and ZAR1 genes in immature bovine oocytes selected by brilliant cresyl blue. *Zygote*. 2009;18(5):209–16.
 28. Mucci N, Aller JF, Kaiser GG, Hozbor F, Alberio RH. Producción *in vitro* de embriones bovinos : suplementación de los medios de cultivo con

- suero *In vitro* production of bovine embryos : serum supplementation to the culture media. Arch Med Vet. 2006;38(2):97–104.
29. Berg U, Reichenbach H. Producción *in vitro* de embriones. In: Biotecnología de la Reproducción. Mar del Plata: INTA; 2008. p. 120–39.
 30. Varisanga MD, Sumantri C, Murakami M, Fahrudin M, Suzuki T. Morphological classification of the ovaries in relation to the subsequent oocyte quality for IVF-produced bovine embryos. Theriogenology. 1998;50(7):1015–23.
 31. Alberio R. Producción *in vitro* de embriones bovinos. Sitio Argentino Prod Anim. 2007;48(1):51–60.
 32. Ghoneimy M. K, El-Naby A, Elraay M, Youssef Y, Sosa G, Abou El-Roos M. Impact of using brilliant cresyl blue stain on oocyte and embryo selection. Egypt J Vet Sci [Internet]. 2017;48(1):43–51. Available from: http://ejvs.journals.ekb.eg/article_4037.html
 33. Peláez VA. Producción *in vitro* de embriones bovinos. Universidad de Cuenca. 2011.
 34. Driancourt MA, Thuel B, Mermillod P, Lonergan P. Relationship between oocyte quality (measured after IVM, IVF and IVC of individual oocytes) and follicle function in cattle. Theriogenology. 1998;49(1):345.
 35. Armstrong DT. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. Theriogenology. 2001;55(1):1303–22.
 36. Gandolfi F, Milanesi E, Pocar P, Luciano AM, Brevini TAL, Acocella F, et al. Comparative analysis of calf and cow oocytes during *in vitro* maturation. Mol Reprod Dev. 1998;49(2):168–75.
 37. Steeves TE, Gardner DK. Metabolism of glucose, pyruvate, and glutamine during the maturation of oocytes derived from pre-pubertal and adult cows. Mol Reprod Dev. 1999;54(1):92–101.
 38. Shabankareh HK, Shahsavari MH, Hajarian H, Moghaddam G. *In vitro* developmental competence of bovine oocytes: Effect of corpus luteum and follicle size. Iran J Reprod Med. 2015;13(10):599–606.
 39. Hazeleper NL, Hill DJ, Stubbings RB, Walton JS. Relationship of morphological and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential *in vitro*. Theriogenology. 1995;43(9):509–22.
 40. Boland MP, Lonergan P, O'Callaghanz D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology and oocyte and embryo development. Theriogenology. 2001;55(01):1323–40.
 41. Ashworth CJ, Toma LM, Hunter MG. Nutritional effects on oocyte and embryo development in mammals: Implications for reproductive efficiency and environmental sustainability. Philos Trans R Soc B Biol Sci. 2009;364(1534):3351–61.



42. Niemann H, Wrenzycki C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology*. 2000;53(2):21–34.
43. Snijders SEM, Dillon P, O’Callaghan D, Boland MP. Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on *in vitro* oocyte development in dairy cows. *Theriogenology*. 2000;53(4):981–9.
44. Al-Katanani Y, Rivera RM, Hansen PJ. Seasonal variation in development of *in vitro* produced bovine embryos. *Vet Rec*. 2002;150(1):486–7.
45. Leibfried L, First NL. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J Anim Sci*. 1979;48(1):76–86.
46. Ueno S, Niimura S. Size of previtelline space and incidence of polyspermy in mouse oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. *J Mamm Ova Res*. 2008;25(5):44–9.
47. Lasienė K, Vitkus A, Valanėiūtė A, Lasys V. Morphological criteria of oocyte quality. *Med Kaunas*. 2009;45(7):509–15.
48. Sirard M, Blondin P. Oocyte quality and embryo production in cattle. *Can J Anim Sci*. 1998;78(4):513–6.
49. Hasler JF. Embryo transfer and *in vitro* fertilization. In: *Comparative Reproductive Biology*. Ames: Blackwell Publishing; 2007. p. 171–211.
50. Samaniego J, Ayala L, Nieto P, Rodas E, Vazquez J, Murillo Y, et al. Competencia del ovocito bovino obtenido por ovum pick-up valorado mediante el azul brillante de cresilo. *Maskana Prod Anim*. 2017;8(2):77–80.
51. Lechniak D, Kaczmarek D, Stanisławski D, Adamowicz T. The ploidy of *in vitro* matured bovine oocytes is related to the diameter. *Theriogenology*. 2002;57(4):1303–8.
52. Majerus V, Le Gal F, De Roover R, Doonay I, Massip A. Maturation competence in related to prepubertal calves oocyte diameter. *Theriogenology*. 1995;20(96):385.
53. Santos P, Chaveiro A, Simoes N, Moreira da Silva F. Bovine oocyte quality in relation to ultrastructural characteristics of zona pellucida , polyspermic penetration and developmental competence. *Reprod Domest Anim*. 2008;43:685–9.
54. Inoue A, Akiyama T, Nagata M, Aoki F. The perivitelline space-forming capacity of mouse oocytes is associated with meiotic competence. *J Reprod Dev*. 2007;53(5):1043–1052.
55. Opiela J, Lucyna K. The utility of Brilliant Cresyl Blue (BCB) staining of mammalian oocytes used for *in vitro* embryo production (IVP). *Reprod Biol*. 2013;13(3):177–83.



56. Bhojwani S, Alm H, Torner H, Kanitz W, Poehland R. Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer. *Theriogenology*. 2007;67(2):341–5.
57. Mirshamsi SM, KaramiShabankareh H, Ahmadi-Hamedani M, Soltani L, Hajarian H, Abdolmohammadi AR. Combination of oocyte and zygote selection by brilliant cresyl blue (BCB) test enhanced prediction of developmental potential to the blastocyst in cattle. *Anim Reprod Sci*. 2013;136(4):245–51.
58. Spikings EC, Alderson J, John JC St. Regulated mitochondrial DNA replication during oocyte maturation is essential for successful porcine embryonic development. *Biol Reprod*. 2007;76(2):327–35.
59. Castaneda CA, Kaye P, Pantaleon M, Phillips N, Norman S, Fry R, et al. Lipid content, active mitochondria and brilliant cresyl blue staining in bovine oocytes. *Theriogenology*. 2013;79(3):417–22.
60. Salviano MB, Collares FJF, Becker BS, Rodrigues BA, Rodrigues JL. Bovine non-competent oocytes (BCB-) negatively impact the capacity of competent (BCB+) oocytes to undergo *in vitro* maturation, fertilisation and embryonic development. *Zygote*. 2015;24(2):245–51.
61. Rodríguez González E, López Béjar M, Velilla E, Paramio MT, Rodríguez-González E, López-Béjar M, et al. Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology*. 2002;57(5):1397–409.
62. Wang L, Lin J, Huang J, Wang J, Zhao Y, Chen T. Selection of ovine oocytes by Brilliant Cresyl Blue staining. *Biomed Biotechnol*. 2012;2012:1–7.
63. Karami Shabankareh H, Azimi G, Torki M, Shabankareh HK, Azimi G, Torki M. Developmental competence of bovine oocytes selected based on follicle size and using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Iran J Reprod Med*. 2014;12(11):771–8.
64. Kempisty B, Jackowska M, Piotrowska H, Antosik P, Wona M, Bukowska D, et al. Zona pellucida glycoprotein 3 (pZP3) and integrin $\beta 2$ (ITGB2) mRNA and protein expression in porcine oocytes after single and double exposure to brilliant cresyl blue test. *Theriogenology*. 2011;75(8):1525–35.
65. Aardema H, Roelen B, van Tol H, Oei C, Gadella B, Vos P. Follicular 17β -estradiol and progesterone concentrations and degree of cumulus cell expansion as predictors of *in vivo*-matured oocyte developmental competence in superstimulated heifers. *Theriogenology*. 2013;80(6):576–83.
66. Hawk HW, Wall RJ. Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro* produced oocytes selection of oocyte and zygotes. *Theriogenology*. 1994;41(8):1571–83.



67. Ruiz S, Astiz S. Producción *in vitro* de embriones (PIV) en biotecnología de la reproducción bovina. *Asoc Nac Espec Med Bov en España*. 2010;9(1):25–32.
68. Gomez Bergstein-Galan T. *Reproduction biotechnology in farm animals*. Curitiba: AvidScience; 2017. 301 p.
69. Fernández A, Díaz T, Muñoz G. *In vitro* production of Bovine embryos. *Rev Fac Ciencias Vet*. 2007;48(1):51–60.
70. Perea F, Quezada A, Mocha A, Argudo G, Ayala L, Mendez S, et al. Efecto de la presión de vacío sobre las características funcionales de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero. *Maskana Prod Anim*. 2017;8(2):69–71.
71. Estrella CA, Suconota AG, Ayala LE. Evaluación de la calidad de ovocitos bovinos obtenidos de folículos con tres tamaños diferentes. *Maskana Prod Anim*. 2017;8(2013):101–3.
72. Lonergan P, Fair T. Maturation of oocytes *in vitro*. *Annu Rev Anim Biosci*. 2016;4(10):255–68.
73. Vanderhyden BC, Armstrong DT. Role of cumulus cells and serum on the *in vitro* maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. *Biol Reprod*. 1989;40(4):720–8.
74. Sirard MA, Blondin P. Oocyte maturation and IVF in cattle. *Anim Reprod Sci*. 1996;42(1–4):417–26.
75. Calder MD, Caveney AN, Westhusin ME, Watson AJ. Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2)(PGE(2)) receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE(2) induces moderate expansion of the bovine cumulus *in vitro*. *Biol Reprod*. 2001;65(2):135–40.
76. Loos F, Maurik P, Beneden T. Structural aspects of bovine oocyte maturation *in vitro*. *Mol Reprod Dev*. 1992;214:208–14.
77. Tatemoto H, Horiuchi T. Requirement for protein synthesis during the onset of meiosis in bovine oocytes and its involvement in the autocatalytic amplification of maturation-promoting factor. *Mol Reprod Dev*. 1995;41(1):47–53.
78. Tatemoto H, Terada T. Involvement of cyclic AMP dependent protein kinase in chromatin condensation before germinal vesicle breakdown in bovine oocytes. *Anim Reprod Sci*. 1996;44(1):99–109.
79. Lévesque JT, Sirard M -A. Effects of different kinases and phosphatases on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*. 1995;42(1):114–21.
80. Levesque JT, Sirard MA. Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B in bovine oocytes. *Biol Reprod*. 1996;55(6):1427–36.



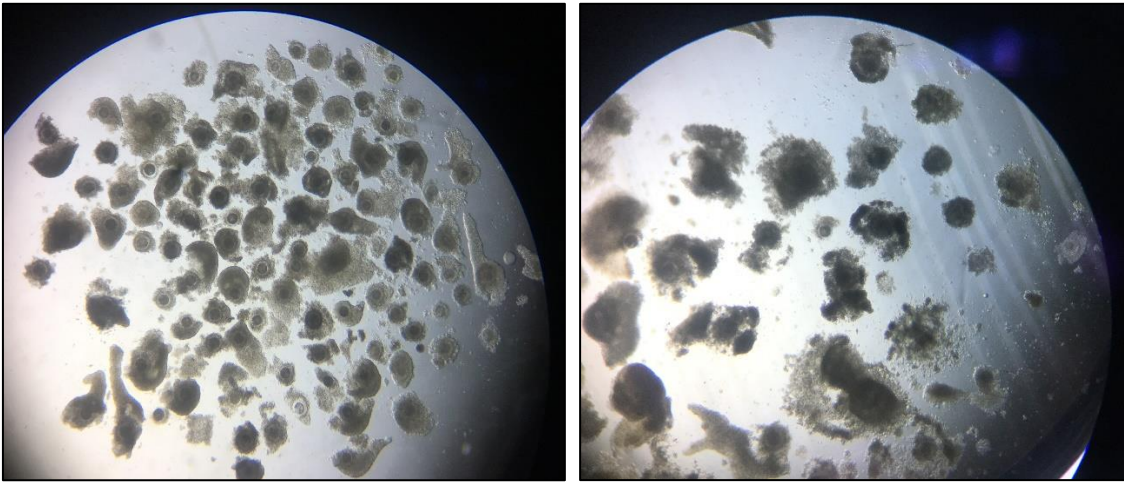
81. Sato E, Matsuo M, Miyamoto H. Meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*: improvement of meiotic competence by dibutyl cyclic adenosine 3'5'-monophosphate. *Anim Sci.* 1989;68(February):1182–7.
82. Crocomo L, Filho Marques WC, Landim-Alvarenga F da C, Bicudo S. Aspectos bioquímicos e ultraestruturais da maturação oocitária. *Veterinária e Zootec.* 2011;18(4):542–52.
83. Conover JC, Gwatkin RB. Pre-loading of mouse oocytes with DNA-specific fluorochrome (Hoechst 33342) permits rapid detection of sperm-oocyte fusion. *J Reprod Fertil.* 1988;82(2):681–90.
84. Pascottini OB, Catteeuw M, Van Soom A, Opsomer G. Holding immature bovine oocytes in a commercial embryo holding medium: High developmental competence for up to 10 h at room temperature. *Theriogenology.* 2018;107(5):63–9.
85. Long C, Damiani P, Pinto C, MacLean RA, Duby RT, Robl JM. Matured *in vitro* under various conditions of fertilization. *J Reprod Fertil.* 1994;(169):361–9.
86. Veshkini A, Khadem AA, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Alamouti AA, Soleimani M, Gastal EL. Linolenic acid improves oocyte developmental competence and decreases apoptosis of *in vitro*-produced blastocysts in goat. *Zygote.* 2016;24(4):537–48.
87. Varago F, Mendonça L, Lagares M de A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Rev Bras Reprodução Anim.* 2008;32(1):100–9.
88. Martí E, Pérez-Pé R, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez J. Comparative study of four different sperm washing methods using apoptotic markers in ram spermatozoa. *J Androl.* 2006;27(6):746–53.
89. Liu B, Cui Y, Yu S jiu. Effect of swim-up and percoll treatment on sperm quality and *in vitro* embryo development in Yak. *J Integr Agric.* 2013;12(12):2235–42.
90. Catala M, Roser M, Roser R, Izquierdo D, Paramio T. Estudio de la actividad mitocondrial de ovocitos de cordera seleccionados mediante el test del BCB (Azul de cresol brillante). In: *Jornadas sobre Producción Animal AIDA.* Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona; 2009. p. 684–6.
91. Singh W, Sonowal J, Das A, Barua P, Gogoi C, Mahanta D, et al. Recovery of bovine oocytes in respect of quality and quantity by using different techniques Recovery of bovine oocytes in respect of quality and quantity by using different techniques. *Jorunal Entomol Zool Stud.* 2018;6(1):250–253 E-ISSN:
92. Kouamo J, Bah GS. Evaluation of bovine (*Bos indicus*) ovarian potential for *in vitro* embryo production in the Adamawa plateau (Cameroon) Evaluation of bovine (*Bos indicus*) ovarian potential for *in vitro* embryo



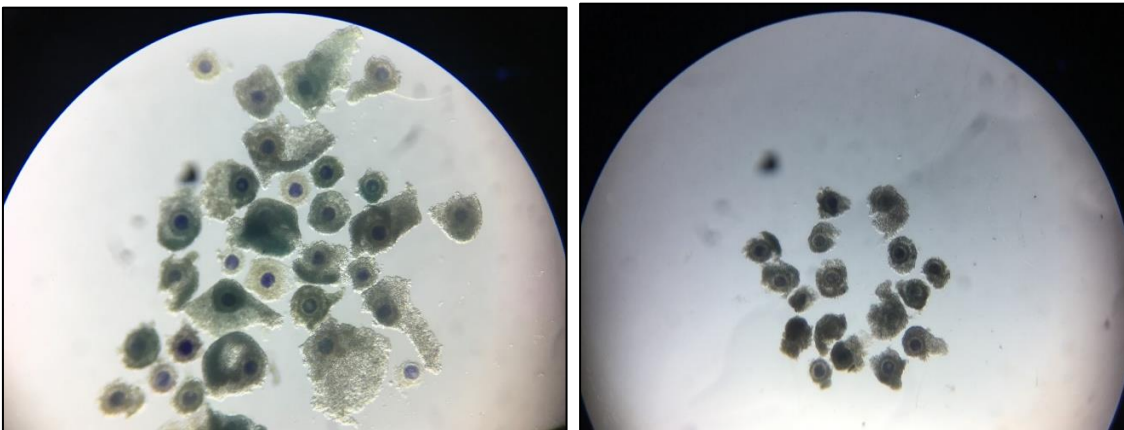
- production in the Adamawa plateau (Cameroon). Open Vet J. 2014;4(2):128–36.
93. Roca J, Martinez E, Vazquez J, Lucas X. Selection of immature pig oocytes for homologous *in vitro* penetration assays with the brilliant cresyl blue test. Reprod Fertil Dev. 1998;13:479–85.
 94. Argudo D, Balvoa T, Tenemaza C, Mendez M, Soria M, Ayala L, et al. Influencia del cuerpo lúteo activo sobre la competencia y características morfológicas de ovocitos bovinos. Maskana Prod Anim. 2017;8(January):117–20.
 95. Alvarado Ulloa J. Evaluación de la calidad de ovocitos provenientes de vaconas criollas y ovarios de matadero. Universidad de Cuenca; 2017.
 96. Mocha Zhispon A, Quezada Contreras A. Evaluacion de la calidad y maduracion de ovocitos bovinos en matadero con tres presiones de vacio. Universidad de Cuenca. Universidad de Cuenca; 2017.
 97. Yoshida N, Niimura S. Size of the perivitelline space and incidence of polyspermy in rabbit and hamster oocytes. Reprod Med Biol. 2011;10(5):31–41.
 98. Montag M, Rings F, Tesfaye D. Evaluation of bovine zona pellucida characteristics in polarized light as a prognostic marker for embryonic developmental potential. Reproduction. 2011;141(7):779–87.

8. ANEXOS

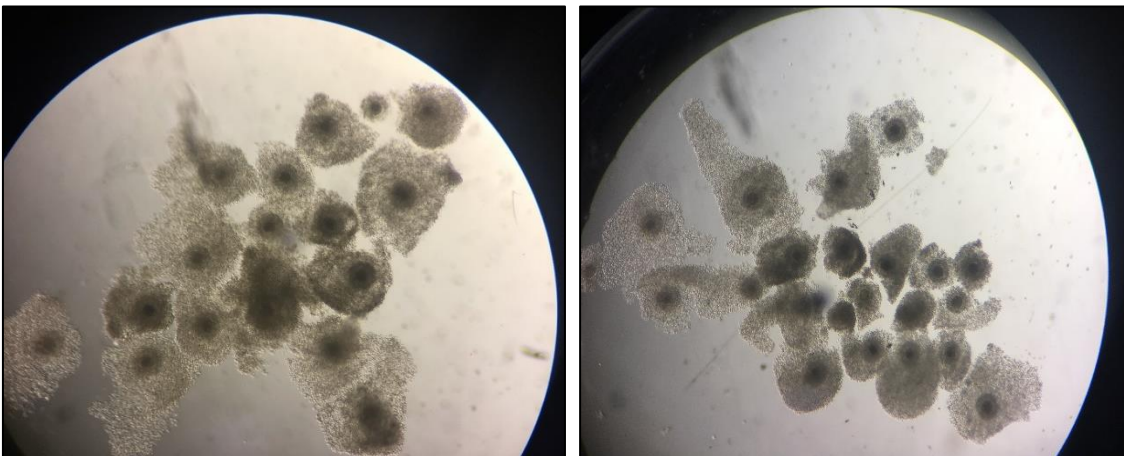
8.1 Fotografías de la investigación



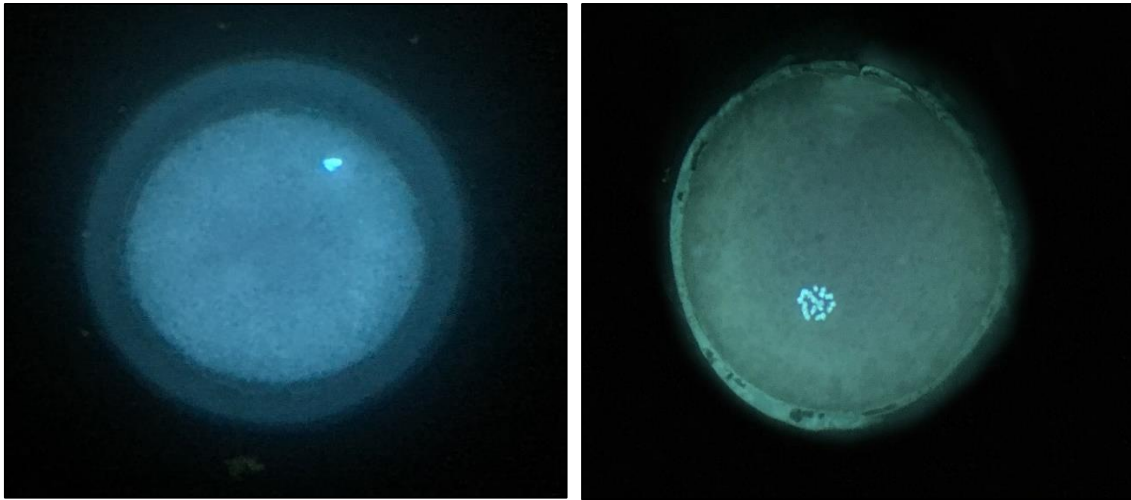
Anexo 1: Ovocitos aptos (categoría A y B) y no aptos (categoría C y D).



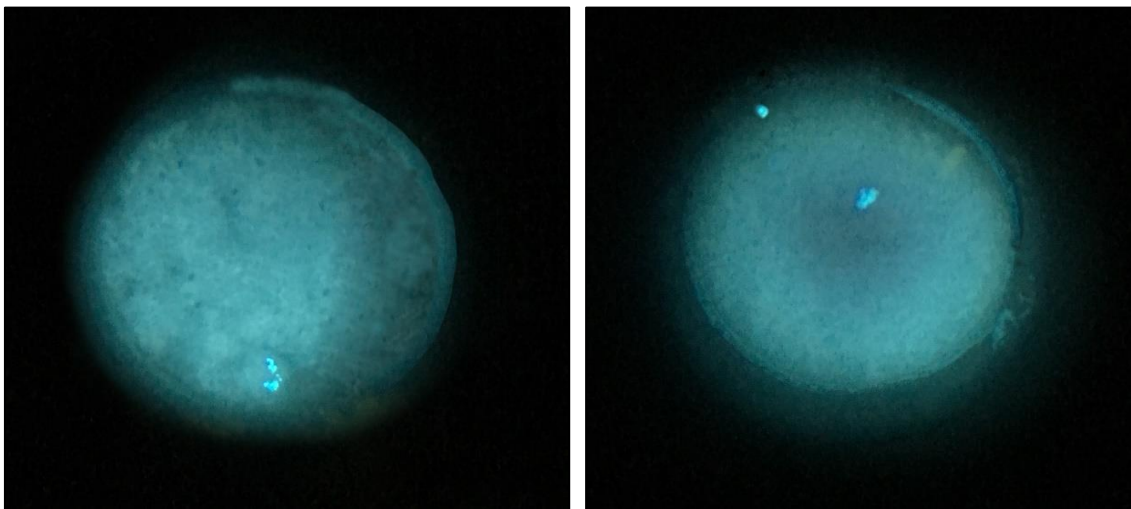
Anexo 2: Ovocitos BCB+ y BCB-



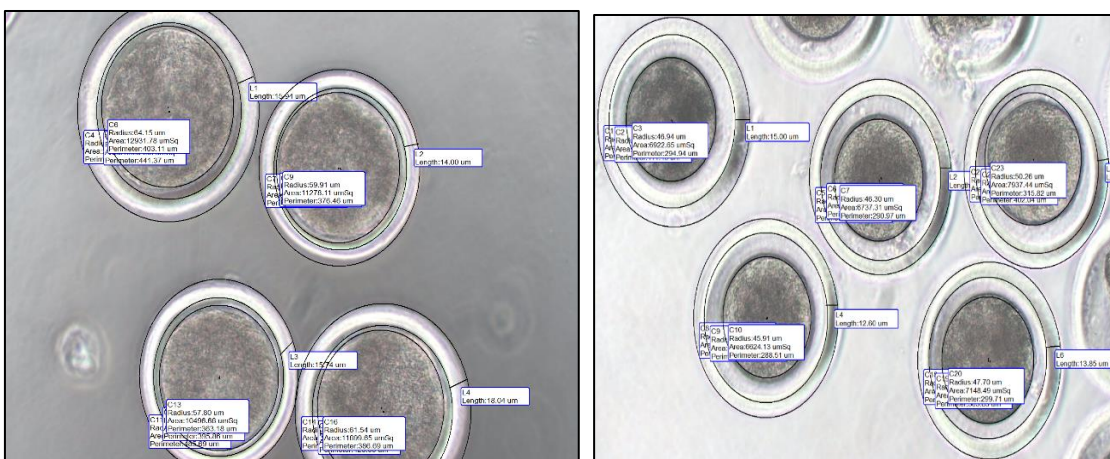
Anexo 3: Expansión de las células del cúmulus luego de la MIV.



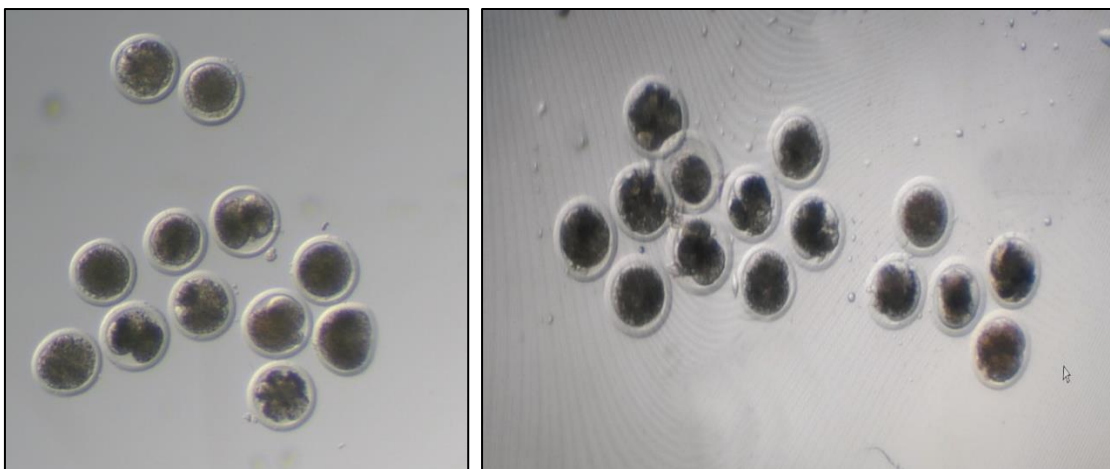
Anexo 4: Ovocitos en estado de GV y GVBD teñidos con Hoechst, vistos con microscopio de fluorescencia.



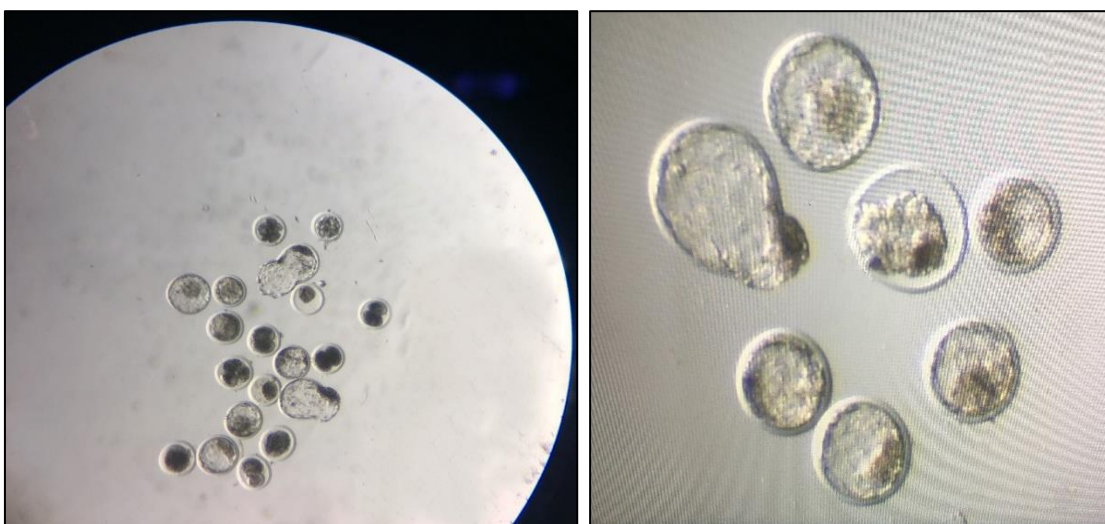
Anexo 5: Ovocitos en estado de MI y MII teñidos con Hoechst, vistos con microscopio de fluorescencia.



Anexo 6: Ovocitos medidos antes y después de la MIV mediante software CaptaVisión.



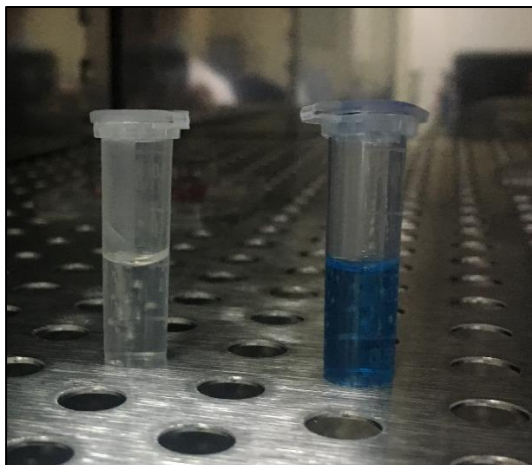
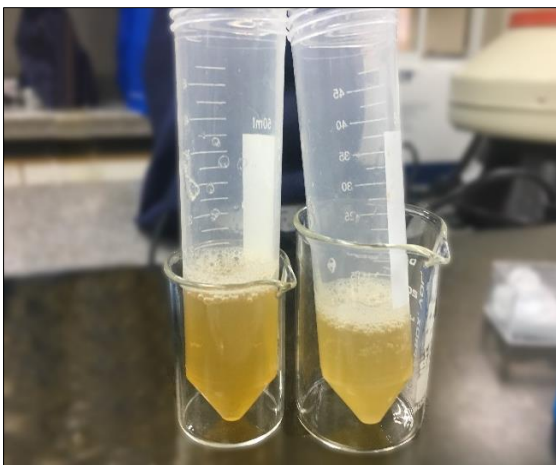
Anexo 7: Evaluación de clivaje, 48 h luego de la FIV



Anexo 8: Blastocistos expandidos y protruidos luego de 8 días de CIV.



Anexo 9: Ovarios bovinos colectados de matadero.



Anexo 10: Líquido folicular colectado luego de aspiración / Tinción BCB.



Anexo 11: Denudado de ovocitos previo a la evaluación de morfometría.

(Todas las imágenes son fuente del Autor)



Anexo 12: Ficha técnica del producto Azul Brillante de cresilo (BCB)

Versión y fecha de revisión: 5 07.10.2017. Fecha de edición: 07.10.2017.



Ficha de Datos de Seguridad Según Reglamento (UE) 830/2015

1169 Azul de Cresilo Brillante (C.I. 51010)

1. Identificación de la sustancia o la mezcla y de la sociedad o la empresa

1.1 Identificador del producto

Denominación:

Azul de Cresilo Brillante (C.I. 51010)

Sinónimo:

Mezcla de oxazinas (Aminodimetil Aminometil Difenoxazonio Cloruros)

Nº de Registro REACH: No hay disponible un número de registro para esta sustancia, ya que la sustancia o su uso están exentos del registro; según el Artículo 2 de la normativa REACH (CE) nº 1097/2006, el tonelaje anual no requiere registro, dicho registro está previsto para una fecha posterior o se trata de una mezcla.

1.2 Usos pertinentes identificados de la sustancia o de la mezcla y usos desaconsejados

Usos: para usos de laboratorio, análisis, investigación y química fina.

1.3 Datos del proveedor de la ficha de datos de seguridad:

PANREAC QUIMICA S.L.U.

C/Garraf 2

Polígono Pla de la Bruguera

E-08211 Castellar del Vallès

(Barcelona) España

Tel. (+34) 937 489 400

e-mail: product.safety@panreac.com

1.4 Teléfono de emergencia:

Tel 24h Panreac Química S.L.U. +(34)937 489 499

Tel Centro de información toxicológica del INTCF +(34)91 562 04 20

2. Identificación de los peligros

2.1 Clasificación de la sustancia o de la mezcla.

2.3 Otros peligros:

No existen más datos relevantes disponibles.



3. Composición/información sobre los componentes

3.1 Sustancias

Denominación: Azul de Cresilo Brillante (C.I. 51010)
Fórmula: $C_{17}H_{20}ClN_3O$ M.= 317,79 CAS [81029-05-2]
Número CE (EINECS): 279-675-0

3.2 Mezclas

No se trata de una mezcla

4. Primeros auxilios

4.1 Descripción de los primeros auxilios

En caso de pérdida del conocimiento nunca dar a beber ni provocar el vómito.

4.2 Principales síntomas y efectos, agudos y retardados

No existen más datos relevantes disponibles.

4.3 Indicación de toda atención médica y de los tratamientos especiales que deban dispensarse inmediatamente

Ingestión:

Beber agua abundante. Provocar el vómito. Pedir atención médica.

Inhalación:

Ir al aire fresco.

Contacto con la piel:

Lavar abundantemente con agua. Quitarse las ropas contaminadas.

Ojos:

Lavar con agua abundante manteniendo los párpados abiertos.

5. Medidas de lucha contra incendios

5.1 Medios de extinción:

Los apropiados al entorno.

5.2 Peligros específicos derivados de la sustancia o la mezcla:

Combustible. En caso de incendio pueden formarse vapores tóxicos.

5.3 Recomendaciones para el personal de lucha contra incendios:

Ropa y calzado adecuados.

6. Medidas en caso de vertido accidental

6.1 Precauciones personales, equipo de protección y procedimientos de emergencia:

Sin indicaciones particulares.

6.2 Precauciones relativas al medio ambiente:

No permitir el paso al sistema de desagües. Evitar la contaminación del suelo, aguas y desagües.

**Anexo 13:** Modelos de registros para la recolección de datos.

HOJA DE REGISTRO DE TESIS: "*Evaluación de la eficacia de la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB) en la determinación de la competencia de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero.*"

JOSÉ MAURICIO DUMA PAUTA



	NUMERO DE SESIÓN										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Fecha											
N° de ovarios colectados											
N° de ovocitos recuperados											
N° de ovocitos aptos											
Ovocitos a tinción BCB (77% de los ovocitos aptos)											
Ovocitos Control (33% de los ovocitos aptos)											
Hora de colocación en BCB											
Hora de colocación en medio MIV											
Hora de colocación en medio FIV											
Hora de fertilización											
Hora de colocación en medio CIV											

Observaciones:



HOJA DE REGISTRO DE TESIS: "Evaluación de la eficacia de la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB) en la determinación de la competencia de ovocitos bovinos obtenidos de matadero"

JOSÉ MAURICIO DUMA PAUTA

PROTOCOLO PIV



	NUMERO DE SESIÓN										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
OVOCITOS CONTROL (T1)											
N° de ovocitos para evaluación de morfometría (pre)											
N° de ovocitos para MIV											
% de Maduración de ovocitos											
N° de ovocitos para Tinción Hoechst y morfometría (post)											
N° de ovocitos para FIV											
N° de cigotos clivados											
N° de ovocitos no fertilizados											
N° de Mórulas											
N° de blastocitos (Tmp- Exp- Pr)											

NUMERO DE SESIÓN



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
OVOCITOS BCB+ (T2)											
N° de ovocitos para evaluación de morfometría (pre)											
N° de ovocitos para MIV											
% de Maduración de ovocitos											
N° de ovocitos para Tinción Hoechst y morfometría (post)											
N° de ovocitos para FIV											
N° de cigotos clivados											
N° de ovocitos no fertilizados											
N° de Mórulas											
N° de blastocitos (T- Exp-Pr)											

OVOCITOS BCB- (T3)											
N° de ovocitos para evaluación de morfometría (pre)											
N° de ovocitos para MIV											
% de Maduración de ovocitos											
N° de ovocitos para Tinción Hoechst y morfometría (post)											
N° de ovocitos para FIV											
N° de cigotos clivados											
N° de ovocitos no fertilizados											
N° de Mórulas											
N° de blastocitos (T- Exp-Pr)											



HOJA DE REGISTRO DE TESIS: "Evaluación de la eficacia de la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB) en la determinación de la competencia de ovocitos bovinos obtenidos de matadero"

JOSÉ MAURICIO DUMA PAUTA

MADURACIÓN NUCLEAR



Estado de maduración de los ovocitos	NUMERO DE SESIÓN										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
OVOCITOS CONTROL (T1)											
Vesícula Germinal (GV)											
Rotura de Vesícula germinal (GVBD)											
Metafase I (MI)											
Metafase II (MII)											
OVOCITOS BCB + (T2)											
Vesícula Germinal (GV)											
Rotura de Vesícula germinal (GVBD)											
Metafase I (MI)											
Metafase II (MII)											
OVOCITOS BCB - (T3)											
Vesícula Germinal (GV)											
Rotura de Vesícula germinal (GVBD)											
Metafase I (MI)											
Metafase II (MII)											